

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
GENES CODIFICANTES DE POLIFENOL OXIDASA (PPO) EN *Theobroma*
cacao L. (CACAO) EN EL CANTÓN QUEVEDO-PROVINCIA DE LOS RÍOS

AUTORA:

JENNY MILENA ACOSTA FARÍAS

DOCENTE TUTORA:

VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS

Quito, febrero del 2017

Cesión de derechos de autor

Yo, Jenny Milena Acosta Farías, con documento de identificación N° 1204504003, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación intitulado: “Clonación, secuenciación y caracterización de genes codificantes de polifenol oxidasa (PPO) en *Theobroma cacao* L. (cacao) en Quevedo-provincia de Los Ríos”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Jenny Milena Acosta Farías
C.I. 1204504003

Quito, febrero del 2017

Declaratoria de coautoría de la docente tutora

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación “Clonación, secuenciación y caracterización de genes codificantes de polifenol oxidasa (PPO) en *Theobroma cacao* L. (cacao) en Quevedo-provincia de Los Ríos” realizado por Jenny Milena Acosta Farías, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero del 2017



Chiluisa Utreras Viviana Pamela

C.I. 1713168258

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

REVISTA CENCIA Y TECNOLOGÍA



Teléfonos: (593 5) 2750320 / 2751430
(593 9) 96806727 / 89593323
Fax: (593 5) 2753300 / 2753303
E-mail: cienciaytecnologia@uteq.edu.ec
Dirección: Km 1.5 vía Quevedo - Santo Domingo
Quevedo-Los Ríos-Ecuador



EL DOCTOR JAIME ALFREDO MORANTE CARRIEL, CATEDRÁTICO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR E INVESTIGADOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO, ECUADOR.

Extiende la siguiente CERTIFICACIÓN a la Srta. Jenny Milena Acosta Farías con número de identificación 120450400-3, estudiante de la Universidad Politécnica Salesiana de la Sede Quito-Ecuador.

La Srta. Acosta Farías realizó su tema de Investigación en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo con el Tema Titulado: "Clonación secuenciación y caracterización molecular de genes codificantes de polifenol oxidasa (PPO) en *Theobroma cacao* L. (cacao) en el Cantón Quevedo – Provincia de Los Ríos" desde Marzo hasta Noviembre del 2016 en el área de Biotecnología bajo la Tutoría del suscrito, la mencionada dispone de gran habilidad intelectual, capacidad para realizar investigaciones, interés para la colaboración, facilidad de comunicación oral y enorme capacidad didáctica, rigor en términos científicos, pero a la vez, creatividad y originalidad a la hora de exponer sus ideas y resultados.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo le presente certificación en Quevedo, Ecuador, al Primer día del mes de Diciembre del 2016.

Cordialmente.



Jaime Morante Carriel, Ph.D.
DOCENTE-INVESTIGADOR
UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Quevedo-Santo Domingo de los Tsáchilas, CP. 170517
Tel. fijo: (593 5) 2757463 Fax: (593 5) 2753303
Tel. Móvil: (593) 0990025197
Quevedo, Ecuador

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres: Willian y Jenny, por su apoyo, comprensión y amor incondicional.

A mi hermana, Angie, por su cariño y afecto.

A mi enamorado, Alberto, siempre pendiente de mí.

A mis amigos, Carolina, Gabriela y Jefferson.

Agradecimientos

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a la Coordinación General de Investigación, Desarrollo e Innovación de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, por la oportunidad de integrarme en sus proyectos de investigación.

A mi tutor experimental, PhD. Jaime Morante Carriel, docente de la UTEQ, que sembró en mí la semilla de la curiosidad y la investigación, gracias infinitas.

A los PhDs. Fabricio Canchignia, Nicolás Cruz y Enrique Nieto, docentes de la UTEQ, gracias por su colaboración, paciencia y orientación.

Al personal de los laboratorios de Biotecnología de la UTEQ.

Índice

1	Introducción	1
2	Marco teórico	4
2.1	Descripción del cantón Quevedo	4
2.2	Cacao	5
2.2.1	Clasificación taxonómica.	6
2.2.2	Descripción botánica.	6
2.2.3	Requerimientos edafoclimáticos.	7
2.2.4	Origen.	8
2.2.5	Grupos genéticos.	9
2.2.6	Enfermedades que afectan al cacao.	11
2.3	Polifenol oxidasas	14
2.3.1	Estructura.	15
2.3.2	Función Biológica.	15
2.3.3	Actividad en los frutos.	16
2.4	Extracción de ARN a partir de tejido foliar	17
2.5	Síntesis de ADNc (ADN complementario)	17
2.6	Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	17
2.7	Clonación de un gen codificante de PPO	19
2.7.1	Ligación con T4 ADN ligasa.	19
2.7.2	Transformación del ADN ligado en células competentes.	19
2.7.3	Extracción ADN plasmídico.	20

2.8	Secuenciación	20
2.8.1	Técnica de secuenciación Sanger.	20
2.9	Caracterización	21
3	Materiales y métodos	22
3.1	Recolección del material vegetal	22
3.2	Extracción de ADN genómico de cacao	23
3.3	Extracción y purificación de ARN total de cacao de alta calidad	24
3.3.1	Eliminación de ribonucleasas.	24
3.3.2	Métodos de extracción de ARN.	24
3.3.3	Tratamiento del ARN con ADNasa.	26
3.4	Síntesis de ADNc para ensayos de amplificación por RT-PCR	26
3.5	Amplificación por PCR	27
3.5.1	Elaboración de la mix de amplificación para PCR.	28
3.5.2	Electroforesis de ADN.	30
3.5.3	Purificación de los fragmentos de ADN de geles de agarosa.	30
3.6	Ligación del ADN para clonación	31
3.6.1	Transferencia de ADN a <i>E. coli</i> mediante transformación.	31
3.7	Secuenciación de ADN	33
3.8	Caracterización de un gen codificante de polifenol oxidasa (PPO)	34
4	Resultados y discusión	35
4.1	Extracción de ADN genómico de cacao	35
4.2	Extracción de ARN total de cacao	35

4.2.1	Método descrito por Chun et al., (2002).	37
4.2.2	Método descrito por Reid et al., (2006)	38
4.2.3	Protocolo optimizado para la extracción de ARN total de cacao.	39
4.2.4	Electroforesis de ARN.	40
4.2.5	Cuantificación del ARN.	41
4.3	Amplificación de un gen codificante de polifenol oxidasa de cacao	42
4.4	Ligación con el vector de clonación y transformación en células competentes	45
4.5	Purificación de ADN plasmídico	47
4.6	Secuenciación de ADN	47
4.7	Caracterización del gen PPO1-Tc	48
5	Conclusiones	54
6	Recomendaciones	55
7	Referencias	56
8	Anexos	62

Índice de tablas

Tabla 1. Síntesis de ADNc a partir de ARN total	27
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en el trabajo.....	28
Tabla 3. Mix para PCR.....	29
Tabla 4. Condiciones de amplificación para PCR	29
Tabla 5. Mix para ligación	31
Tabla 6. Cuantificación de ARN total por espectrofotometría	41
Tabla 7. Parentesco molecular de la proteína PPO1-Tc con otras PPOs	49

Índice de figuras

Figura 1. Mapa político del cantón Quevedo.....	4
Figura 2. Lugar de recolección del material vegetal.....	23
Figura 3. Electroforesis de ADNg en gel de agarosa al 1% (p/v) para hojas de cacao.....	35
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) usando el método de Chun sin modificaciones.....	37
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) usando el método de Chun con modificaciones.....	38
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) usando el método de Reid sin modificaciones.....	39
Figura 7. Electroforesis de ARN total en geles de agarosa al 1.5% (p/v).....	41
Figura 8. Electroforesis de ADNg en gel de agarosa al 1% (p/v).....	42
Figura 9. Electroforesis de ADNg en gel de agarosa al 1% (p/v).....	43
Figura 10. Electroforesis de ADNc en gel de agarosa al 1% (p/v)	44
Figura 11. Electroforesis en geles de agarosa 1% de fragmentos de ADN purificados.....	45
Figura 12. Colonias de <i>Escherichia coli</i> blancas y azules	46
Figura 13. Electroforesis de ADN plasmídico en gel de agarosa al 1% (p/v)	46
Figura 14. Electroforesis de ADNp purificado en gel de agarosa al 1% (p/v)	47
Figura 15. Secuencia del gen PPO1-Tc identificado en este trabajo	48
Figura 16. Aminoácidos codificados por el gen PPO1-Tc.....	48
Figura 17. Tripletes codificados para aminoácidos	52
Figura 18. Alineamiento múltiple del gen PPO1-Tc.....	53

Índice de anexos

Anexo 1. Planta de cacao susceptible a monilia L44H88	62
Anexo 2. Planta de cacao resiste a monilia L8H12	62
Anexo 3. Incubación a 65°C durante la extracción de ARN total de cacao.....	63
Anexo 4. Electroforesis en TAE 1X	63
Anexo 5. Incubación de las colonias de <i>E.coli</i> transformadas en medio SOC	64
Anexo 6. Esquema de orientación de los oligonucleótidos empleados en este trabajo	64
Anexo 7. Alineamiento múltiple de PPOs no caracterizadas de cacao	69
Anexo 8. Combinaciones de oligonucleótidos y tamaño esperado de amplicones....	70
Anexo 9. Vector de clonación usado y sitios de unión primers M13F y M13R.....	70

Resumen

En Ecuador, las plantaciones de cacao presentan bajos promedios de producción debido a la diversidad de patógenos, especialmente a la infección por *Moniliophthora roreri* (monilia). Se cree que existe una relación entre el ataque del hongo y el aumento de los niveles de expresión de genes codificantes de polifenol oxidasas (PPOs) como mecanismo de defensa ante patógenos y herbívoros en diferentes plantas. Para la identificación de genes que codifican para PPOs, se seleccionaron hojas de cacao Nacional, provenientes de plantas resistentes y susceptibles a monilia, ubicadas en la Finca Experimental La Represa, propiedad de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Se afinó un protocolo de extracción de ARN total de alta calidad para hojas de cacao recalcitrantes. Después de su retrotranscripción a ADNc, se realizaron ensayos de amplificación por PCR con diferentes primers, diseñados a partir de secuencias conservadas de PPOs. Los productos de amplificación permitieron la identificación de un gen de 961 pb, similar a un gen que codifica para la PPO predictiva de PPO de *Theobroma cacao* depositada en NCBI (XP_017978715.1). La identificación de este gen, es fundamental para evaluar a futuro los niveles de expresión y cuantificación en diferentes estados de desarrollo del fruto. Dicha cuantificación permitirá proponer herramientas de control para monilia y construir las bases para el mejoramiento genético del cacao Nacional.

Palabras clave: polifenol oxidasas, cacao, identificación, expresión génica

Abstract

In Ecuador, cocoa plantations often present low yields due to a great diversity of pathogens, especially *Moniliophthora roreri* (monilia), which cause a substantial infection. It is thought that the fungi attack and an uprising of expression levels of encoding polyphenol oxidases (PPOs) genes are related as a defense mechanism in the presence of pathogens and herbivores in different plants. In order to identify the encoding genes of PPOs, leaves of National cocoa, coming from resistant and susceptible plants were collected, located in “La Represa”, property of Universidad Técnica Estatal de Quevedo. An extraction protocol for total RNA for recalcitrant cocoa leaves was optimized. After its reverse-transcription to cDNA, amplifying PCR assays were performed with different primers, designed from conserved PPOs sequences. Amplifying products allowed to identify a gen of 961 bp, similar to a gene that encodes a predicted PPO from *Theobroma cacao* stored in NCBI (XP_017978715.1). In addition to identify the gen, it is fundamental to evaluate in the future expression levels and quantify them in different development fruit stages. This quantification will be important not only to propose tools for monilia control but also to enhance genetic improvement of National cocoa.

Key words: polyphenol oxidases, cocoa, identification, gene expression

Introducción

La calidad de los frutos ha sido analizada por el consumidor desde tiempos inmemorables, por lo que, el agricultor es presionado por los clientes para liberar al mercado productos que satisfagan sus necesidades. La calidad se valora mediante la medición de las características organolépticas, características intrínsecas, así como la apariencia del producto (Morante *et al.*, 2014). Las PPOs (polifenol oxidasas) son importantes en la industria agro-alimentaria e influyen en la calidad de un producto, la cual disminuye considerablemente cuando ésta presenta pardeamiento enzimático en su estructura; la destrucción de los compartimentos cloroplásticos y las vacuolas provocan la liberación de sus contenidos lo que hace posible la reacción enzimática (Morante *et al.*, 2014).

Las polifenol oxidasas son enzimas que usan el oxígeno molecular para convertir los fenoles en quinonas (Tran *et al.*, 2012). La oxidación de los sustratos fenólicos es catalizada por las enzimas PPOs que da como resultado la formación de un complejo proteico y la aparición de manchas cafés compuestas por melanina en la estructura de los frutos. Aunque las funciones específicas de las PPOs en los frutos intactos no están esclarecidas; se sugiere que su principal acción en los frutos con cierto tipo de daño es la defensa contra herbívoros y patógenos, incluso con una disminución de su contenido nutricional. Adicionalmente, se ha evidenciado que las PPOs responden a estímulos como el estrés abiótico (Boeckx *et al.*, 2015).

No obstante, la distribución de las PPOs es amplia, existen plantas de varias familias de interés económico que contienen una gran cantidad de PPOs en su constitución y que se presentan a manera de isoenzimas, cuya función se desconoce; entre las cuales se menciona *Solanum tuberosum* (papa), *Glycine max* (soya), *Solanum melongena*

(berenjena), *Theobroma cacao* (cacao). En algunas plantas se ha observado que los niveles de fenoles presentes en su estructura aumentan en el momento de la recolección. Sin embargo, en el momento de la maduración los niveles de PPOs se mantienen casi constantes (Morante *et al.*, 2014).

Theobroma cacao es una planta de interés nacional, puesto que implica una decena de actores en los procesos iniciales como siembra y mantenimiento de la planta hasta la cosecha y elaboración de productos procesados. Las zonas de producción del cacao son las regiones de la Costa y Amazonía en Ecuador, siendo de mayor enfoque la provincia de Los Ríos cuya fuente principal de ingresos proviene del agro (Guerrero, 2014). De acuerdo al Boletín emitido por el Ministerio de Comercio Exterior, se ubica con el 6.69% el grupo de productos denominado Cacao y elaborados durante el período Enero-Abril del 2015 en el apartado de exportaciones no petroleras a los principales mercados de Norteamérica, Europa y Asia; con lo que se deduce su importancia para la economía del país (Ministerio de Comercio Exterior, 2015).

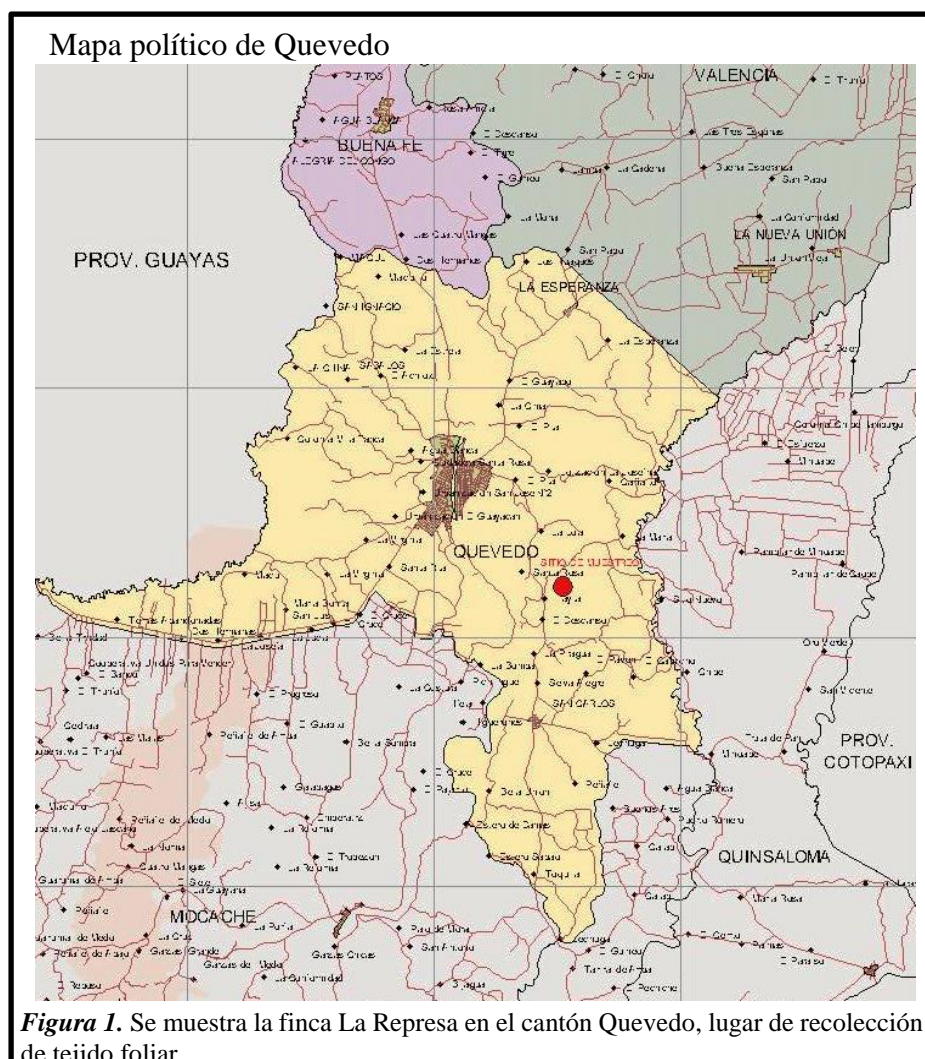
Mediante el uso de aplicaciones biotecnológicas y moleculares se pretende identificar, secuenciar y caracterizar al menos un gen responsable de la síntesis de PPOs en cacao como parte de un estudio pionero en el país que pretende buscar mecanismos biológicos de defensa de las plantas de cacao frente a patógenos.

La identificación de los genes que se encargan de la síntesis de PPOs en cacao supone un aporte significativo para la ciencia y por ende a la economía de Ecuador a través de la resistencia del cacao a las principales enfermedades como monilia, escoba de bruja, entre otras; mejorando de esta manera la cadena productiva, los réditos percibidos y la valoración a nivel mundial de este producto.

Para la realización de la investigación se presenta como objetivo general clonar, secuenciar y caracterizar molecularmente al menos un gen codificante de polifenol oxidasa (PPO) en *Theobroma cacao* L. (cacao) en el cantón Quevedo-Provincia de Los Ríos, debido a la importancia del cultivo en la provincia y el país. Como objetivos específicos se detalla extraer ARN total puesto que se quiere evidenciar la actividad del gen(es) en la planta. Consecutivamente, sintetizar ADNc a partir de ARN total para luego clonar los segmentos de interés en un vector de clonación. Como paso siguiente, secuenciar ADNc mediante la técnica Sanger y finalmente caracterizar a través de herramientas bioinformáticas.

Se establece como hipótesis nula que las hojas provenientes de plantas resistentes y susceptibles a monilia no poseen genes codificantes de PPOs y como hipótesis alternativa la presencia de al menos un gen codificante de PPOs en plantas resistentes y susceptibles a monilia.

Marco teórico



2.1 Descripción del cantón Quevedo

Quevedo es uno de los trece cantones pertenecientes a la provincia de Los Ríos, situado en el centro de la Costa ecuatoriana, constituye un puerto fluvial importante de Ecuador y zona de intenso tráfico terrestre (figura 1).

El cantón consta de nueve parroquias urbanas: San Camilo, San José, Guayacán, Nicolás Infante Díaz, San Cristóbal, 24 de Mayo, 7 de Octubre, Venus del Río Quevedo y Viva Alfaro; y dos parroquias rurales: San Carlos y La Esperanza. Limita al norte con los cantones Buena Fe y Valencia, al sur con el cantón Mocache, al este

con Ventanas y Quinsaloma y al oeste con el cantón El Empalme. Su población es de 150 mil habitantes aproximadamente (GAD San Carlos, 2016).

La principal actividad económica es la agropecuaria y se encuentra a 250 km de Quito y a 170 km de Guayaquil. Su clima se estima entre 23°C a 32°C, a 74 msnm, extensión de 190 km², precipitación anual estimada en 2224 mm y corresponde al área agroecológica de bosque semi-húmedo tropical (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, 2016).

En este ambiente, el cacao representa una parte importante para la economía de Quevedo y del país, con un volumen de exportación de cacao en grano de 260 mil toneladas métricas en 2015 y productos derivados de cacao (Moncayo, 2016), lo cual constituye la principal fuente de ingresos económicos para las familias que dependen directamente del cultivo de cacao.

2.2 Cacao

En la actualidad, uno de problemas a los que se enfrentan los productores de cacao, es a la incidencia de enfermedades, las cuales producen efectos diversos en las plantas, reduciendo de manera significativa su producción. En este sentido, el empleo de herramientas moleculares es una alternativa de investigación controlada que permite descubrir genes potencialmente relacionados con la tolerancia/resistencia a enfermedades causadas por diferentes patógenos y herbívoros. La identificación de estos genes permitirá diseñar estrategias de mejoramiento genético de plantas de cacao, mediante diversas aproximaciones moleculares (expresión génica, mapeado de genes en el genoma de cacao, expresión y sobreexpresión de proteínas, cuantificación de proteínas y construcción de híbridos) (Sellés-Marchart *et al.*, 2008).

2.2.1 Clasificación taxonómica.

La clasificación taxonómica del cacao pertenece al Grupo para la Filogenia de las Angiospermas (APG) versión IV, del inglés Angiosperm Phylogeny Group (Hilger, 2016), que reemplaza a las versiones anteriores publicadas en 1998, 2003 y 2009.

El cacao se ajusta a la siguiente clasificación: Reino: Plantae, Clado: Core Eudicots, Subclado: Rosids, Subclado: Malvids, Orden: Malvales, Familia: Malvaceae (incluye Sterculiaceae, Tiliaceae y Bombacaceae), género: *Theobroma*, especie: *cacao* L (Hilger, 2016).

2.2.2 Descripción botánica.

Theobroma cacao L. es una especie perenne que cuenta con un genoma amplio, de naturaleza alógama, es decir que se reproduce mediante polinización cruzada (Enríquez, 2004).

La especie vegetal alcanza longitudes promedio entre 5 a 8 metros de altura. La distribución de sus ramas varía acorde a su altura, por efecto de las condiciones ambientales y manejo (Suárez *et al*, 1993). La primera horqueta se presenta a la altura de 0.80 o 1.20 metros de altura, sin embargo en árboles reproducidos vegetativamente no existe una horqueta principal (Enríquez, 2004).

La raíz principal es pivotante con longitudes de 1.50 metros, que luego desarrollan raíces secundarias bajo la superficie de su sombra (Enríquez, 2004). Una diferencia notable con el cacao obtenido por reproducción vegetativa es la ausencia de raíz pivotante, compensando con varias raíces principales (Suárez *et al*, 1993).

La longitud de las hojas va de 10 a 20 cm y de 5 a 12 cm de ancho con ápice acuminado, bordes lisos y nerviación penninervia (Enríquez, 2004).

Las flores de color rosado son hermafroditas, miden de 1 a 3 centímetros de longitud y de 0.5 a 1 centímetros de diámetro (Suárez *et al*, 1993). Crecen en los tejidos adultos del tronco y ramas que se agrupan en inflorescencias denominadas cima dicasiforme, de manera coloquial cojín floral. Cada cojinete alberga entre 40 a 60 flores (Suárez *et al*, 1993). La floración inicia al tercer año en árboles de semilla y a partir de los 14 meses en árboles de reproducción vegetativa (Enríquez, 2004).

El fruto es una mazorca y se encuentra sostenido al tallo por un pedúnculo firme y corto, cuyo origen se desprende del pedicelo de la flor. La forma y el tamaño son variables, que sirven como parámetros de diferenciación taxonómica (Enríquez, 2004). En cada mazorca se encuentran de 20 a 50 semillas o almendras unidas a un eje central llamado placenta o maguey (Suárez *et al*, 1993). La semilla está cubierta por un mucílago ácido y azucarado. El color de las semillas varía conforme a la variedad que van desde el blanco cenizo hasta un morado oscuro pasando por todas las tonalidades (Enríquez, 2004). Los cotiledones son las masas carnosas que componen la semilla y son aquellas que forman el producto que luego de su secado y fermentación constituyen el producto de interés económico y comercial.

2.2.3 Requerimientos edafoclimáticos.

Debido al origen amazónico del cacao, los requerimientos edafoclimáticos influyen directamente en la producción y resistencia a las enfermedades, se notan mayores índices de productividad y resistencia en entornos ambientales originarios de las plantas silvestres (Amores *et al*, 2009).

La temperatura media anual se encuentra alrededor de los 25°C y no debe descender los 21°C. Se registran varios inconvenientes con las altas temperaturas como baja dominancia apical y dificultades en la floración y desarrollo foliar; por otro lado, las

bajas temperaturas afectan en la maduración de los frutos que se extiende entre los 167 y 205 días, en los días calurosos la maduración ocurre entre los 140 y 175 días, además se ve afectada la calidad de la manteca de cacao por la disminución del punto de fusión por el aumento de la proporción de las grasas saturadas (Amores *et al*, 2009).

El componente luminoso se relaciona con la fotosíntesis, transpiración, crecimiento celular, entre otros procesos. La latitud, tiempo y nubosidad son factores que influyen en la radiación que recibe una zona determinada. La radiación recibida en Ecuador es constante a lo largo del año, sin embargo la nubosidad influye en la radiación que llega a las plantas fotosintéticamente activa, que se encuentra entre los 400-700 nm. Las plantas de cacao en sus estados tempranos requieren sombra que permita el paso del 30-50% de la luminosidad total. Cabe mencionar que la falta de sombra, estrés térmico e hídrico bajan la productividad y causa la muerte de árboles cada año después de la siembra (Amores *et al*, 2009).

Los niveles de humedad relativa comprendidos entre el 75 y 80% son ideales para el crecimiento y transpiración controlada, no obstante valores superiores al 85% combinado con precipitación y altas temperaturas estimulan la presencia de enfermedades causadas por hongos como la escoba de bruja, mazorca negra y moniliasis que son un gran problema en el país.

2.2.4 Origen.

Es una especie diploide (2n) endémica de los bosques de América del Sur. Se cree que su domesticación ocurrió hace 3000 años aproximadamente (Amores *et al*, 2009).

Se presume que el cacao Nacional de Ecuador tuvo origen en el lado este de la Cordillera de Los Andes, específicamente cercano a los ríos de Morona, Nangaritza y

Zamora en la Amazonía (Motamayor *et al*, 2008), no obstante la diversidad genética existente en la Amazonía no se ve representada en la actualidad en las áreas de domesticación.

2.2.5 Grupos genéticos.

Dado que la domesticación es un proceso continuo, se clasifica al cacao en tres grupos principales: Criollo, Trinitario y Forastero (Bekele *et al*, 2006). Se creía que el cacao Nacional formaba parte de los tres grupos tradicionales por compartir características con el complejo Nacional x Trinitario; sin embargo, estudios moleculares han confirmado la existencia de cuatro grupos de cacao genéticamente diferentes (Amores *et al*, 2009).

El grupo genético Criollo se encuentra principalmente en América Central, México y varios sectores de Venezuela y Colombia que representa el primer caso de domesticación del cacao (Loor *et al*, 2009). Se incluyen genotipos que presentan almendras cuyos colores comprenden el blanco marfil a violeta pálido o rosado (Amores *et al*, 2009). Al ser de fácil domesticación y adaptación a diversas zonas del planeta sus características de productividad y resistencia a enfermedades son pobres (Loor *et al*, 2009).

El grupo Forastero posee gran diversidad genética que incluye colecciones de poblaciones muy diversas entre sí en áreas desde Colombia a las Guyanas (Loor *et al*, 2009). Originarios de la cuenca alta del río Amazonas; presentan mazorcas con surcos y rugosidad distintiva que al madurar adquieren un tono amarillo además las almendras son medianamente planas y sus flores presentan estaminoides violetas. Se denomina cacao forastero a los árboles usualmente cultivados en Brasil, el oeste de África además de varios países de América Central y América del Sur (Amores *et al*, 2009).

El Complejo Trinitario por su parte se caracteriza por ser un híbrido originario de Trinidad, que se originó del cruce entre el cacao criollo de Trinidad con cacao Forastero proveniente de la cuenca del río Orinoco en Venezuela. Al ser altamente polimórfico sus descripciones son variadas, que se evidencia con mazorcas de varias formas y colores que varían del verde al rojo en sus estados de madurez, almendras de variados tamaños con cotiledones violeta oscuro. Este complejo actualmente representa aproximadamente el 25% de la producción mundial (Amores *et al*, 2009).

2.2.5..1 Nacional.

La variedad de cacao Nacional es originaria de la Amazonía ecuatoriana (Motamayor, y otros, 2008). Se presume que los frutos de las plantas originarias de la Amazonía atravesaron la Cordillera de los Andes hacia la costa por medio de monos y ardillas, con lo que se explica la similitud de las primeras plantas de cacao encontradas en la costa ecuatoriana a lo largo del río Guayas que tiene como afluentes los ríos Daule y Babahoyo -sectores a los cuales se llamó “Arriba”- y la Amazonía ecuatoriana -específicamente de las zonas de Archidona y Macas- mediante el análisis molecular de mazorcas y semillas (Loor G. , 2007).

Se afirma que la provincia de Zamora Chinchipe es el centro de domesticación del cacao Nacional, afirmación que se refuerza con la proximidad geográfica entre la primera plantación costera ubicada en la provincia de Guayas y ejemplares ubicados en las ciudades amazónicas de Archidona y Macas (Loor *et al*, 2013).

Los árboles de la variedad Nacional tienen como característica principal el intenso olor floral que es apreciado por mercados internacionales con denominación de origen “Arriba”. Entre los años de 1910-1920 aparecieron las enfermedades causadas por *Moniliophthora spp.*, por lo que se introdujeron al país materiales foráneos a fin de

mejorar la resistencia de los cultivos a las enfermedades, acción que trajo como consecuencia la reducción de las áreas de cultivo de la variedad Nacional (Loor *et al*, 2009).

Los frutos de tipo Nacional son elípticos, levemente ásperos con ápice puntiagudo y prominente (Quiroz & Soria, 1994).

2.2.6 Enfermedades que afectan al cacao.

En Ecuador las principales enfermedades que atacan los cultivos de cacao son causadas por *Phytophthora* spp, *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* (Amores *et al*, 2009). *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri*, causantes de escoba de bruja y moniliasis respectivamente, ocasionan pérdidas del 60% de la producción. Se define a una enfermedad como la evolución natural de cualquier proceso patológico, desde su inicio hasta su resolución; por lo que para la aparición de una enfermedad se requiere el desequilibrio entre tres factores; agente causal, huésped y medio ambiente (Leavell & Clark, 1965).

M. perniciosa se identifica fácilmente con la deformación de los brotes terminales que se ramifican y se alargan para luego dejar hojas sin desarrollar; las mazorcas que se infectan en las primeras etapas de desarrollo se deforman y las que son infectadas en estados de maduración se pudren. El brote hipertrofiado y ramificado de manera anormal empieza a secarse por lo que se deduce que el hongo ha completado su crecimiento (Suárez *et al*, 1993). Por otro lado, la enfermedad de la mazorca negra causada por los hongos pertenecientes al complejo *Phytophthora* ataca a la planta en su totalidad pero los daños se evidencian en las mazorcas. El fruto enfermo presenta manchas oscuras circulares que conllevan a la pudrición total en un lapso de 10 a 15 días (Enríquez, 2004). En Ecuador la especie con mayor alcance es *P. palmivora*

(Osorio, 2010). Sin embargo, la enfermedad no es de gran importancia económica en Ecuador.

2.2.6.1 Moniliasis.

La enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora roreri* que constituye un problema de gran intensidad en el sector agronómico del país, se estima que ha provocado el abandono de numerosas plantaciones por el grado de infección que puede alcanzar hasta el 80%. Fue descrita por primera vez en Quevedo, provincia de Los Ríos, en 1914 (Villavicencio & Jiménez, 2010).

La adaptación del hongo requiere altitudes entre 0 – 1520 msnm, con precipitación entre 780 – 5500 mm y una temperatura entre 18 – 28°C, además las esporas requieren humedad relativa cercana al 100% para la germinación (Villavicencio & Jiménez, 2010)

M. roreri actúa principalmente en los frutos y su contagio es rápido por la diseminación de las esporas por el viento, estas crecen de manera abundante en la superficie de la mazorca de cacao para luego colonizar el interior de este, los síntomas se evidencian aproximadamente 60 días después de la infección (Solís & Suárez, 2006).

2.2.6.1.1 Taxonomía.

Se clasifica de acuerdo al trabajo de Evans y colaboradores en 1978, en el que se clasifica en reino: Fungi, Phylum Basidiomycota, Clase Basidiomycetes, Orden Agarical, Familia Marasmiaceae, género *Moniliophthora* y especie *roreri* Cif. y Par (Villavicencio & Jiménez, 2010).

2.2.6.1.2 *Mecanismo de acción del patógeno.*

Las conidias del hongo sobreviven sobre las mazorcas de cacao infectadas que aún se encuentran unidas a la planta mediante el pedicelo; cuando el patógeno se ubica a nivel intercelular es porque las esporas han germinado sin importar la edad de la mazorca y los síntomas de la enfermedad se pueden visibilizar (Villavicencio & Jiménez, 2010). El ciclo del patógeno varía entre 50 - 60 días desde que el fruto contrae la infección hasta que se completa la esporulación (Arévalo *et al*, 2004).

Las esporas pueden transportarse con facilidad por el viento y otros agentes hacia otros frutos para reiniciar el proceso de infección. Las mazorcas que se mantienen adheridas a la planta son la principal fuente de inóculo (Enriquez & Soria, 1978).

2.2.6.1.3 *Síntomas de la enfermedad.*

Las mazorcas presentan maduración prematura, marchitez y secamiento en sus estados tempranos comprendidos hasta los dos meses de edad; en frutos de mayor edad, específicamente a partir del segundo mes al tercer mes, se evidencian abultamiento, puntos verdes oscuros y deformaciones que después dejan ver manchas cafés con puntos cremas que son las esporas. La descomposición de los tejidos se deriva en pérdida de las almendras como producto de la desecación progresiva hasta alcanzar la momificación (Villavicencio & Jiménez, 2010). Cuando se observan frutos momificados en los árboles se presume contaminación en el resto de la plantación.

Las plantas al ser atacadas por patógenos o herbívoros emiten señales de defensa que permiten la activación del sistema inmune contra las amenazas, que a su vez contrarrestan el ataque mediante estructuras como pelos, tricomas, espinas, hojas gruesas y/o liberación de sustancias que tienen actividades tóxicas, repelentes o

antinutricionales como terpenoides, alcaloides, antocianinas, quinonas y fenoles (Constabel & Barbehenn, 2008).

En varias especies de plantas existen mecanismos de regulación génica que inciden de manera directa en su defensa. Muchas investigaciones realizadas hasta el momento sugieren que las polifenol oxidasas tienen funciones biológicas asociadas a mecanismos de defensa en plantas frente a patógenos y herbívoros (Mayer, 2006). Tal es el caso de *Spodoptera litura*, *H. armígera*, *Bemisia tabaco*, *Tetranychus cinnabarinus*, *Myzus persicae*, *Empoasca fabae*, *Aphis medicaginis*, *S. exigua* y *Agelastica alni* (War *et al*, 2012).

El descubrimiento de genes codificantes de PPOs permitirá sentar las bases necesarias para estudios de sobreexpresión de proteínas y poder así, analizar los niveles de expresión de dicha proteína (Sellés-Marchart *et al*, 2008).

2.3 Polifenol oxidasas

Las polifenol oxidasas (PPOs) son enzimas ubicuas altamente reactivas presentes en los compartimentos vegetales, que dan lugar al pardeamiento enzimático al romperse la compartimentación celular cuando entran en contacto con los sustratos fenólicos, contenidos en la vacuola (Llorente, 2010).

Las reacciones de oxidación mediadas por las PPOs en presencia de oxígeno entre compuestos que presentan similitud con *o*-difenoles originan *o*-quinonas que luego se polimerizan con sustancias fenólicas y producen pigmentos marrones (García *et al*, 2012).

Por lo tanto, la definición más adecuada de las PPOs es:

La polifenol oxidasa (PPO) es una metaloenzima que se encuentra ampliamente distribuida en plantas y hongos. Contiene dos átomos de cobre en

el sitio activo que catalizan dos tipos de reacciones usando O₂ como agente oxidante: (a) la *o*-hidroxilación de monofenoles para producir *o*-difenoles (actividad monofenol monoxigenasa E.C. 1.14.18.1); y (b) la posterior oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad catecolasa E.C. 1.10.3.1). (Muñoz *et al*, 2007, p. 1).

Las PPOs son codificadas por una familia de genes, lo que se demuestra con estudios moleculares recientes que la familia PPO se expresa a diferentes rangos en varios órganos y a condiciones fisiológicas y ambientales variadas (Kim *et al*, 2001).

2.3.1 Estructura.

Las polifenol oxidasas presentan dos iones de cobre en su centro activo que acoplan oxígeno atmosférico durante las reacciones de oxidación en una posición *orto*- a un grupo hidroxilo existente para convertirlos en quinonas (Mayer, 2006). Además, en su estructura, la enzima incorpora dos o tres histidinas ligadas al sitio activo, cabe mencionar que las histidinas son un rasgo conservado a lo largo de la evolución en este tipo de enzimas (Gil *et al*, 2016). Además se encontró una región conservada para PPOs que se localizó entre la región rica en aminoácidos que presentan un grupo hidroxilo y un dominio de transferencia tilacoidal. El tamaño de las proteínas PPOs se encuentra en el rango de 54 a 62 kD (Sellés-Marchart *et al*, 2008).

2.3.2 Función Biológica.

Las PPOs son un misterio para la ciencia a pesar de su estudio continuo hace más de 100 años cuando fueron descritas por primera vez por Gabriel Bertrand en 1896 (Llorente, 2010). Estas enzimas fomentan la formación de quinonas altamente reactivas que reaccionan con grupos amino o sulfhidrilo de las proteínas presentes en

el medio que dan lugar a cambios físicos, químicos y nutricionales del alimento (García *et al*, 2012).

Aunque su función es una incógnita por la dificultad de localización en rutas metabólicas, se sugiere la participación de las PPOs en mecanismos de defensa a estrés biótico y abiótico. Se describe el caso de la ruptura y polimerización de los tricomas y la disminución en la defoliación de plantas ante el ataque de insectos; en el caso del trigo los ejemplares resistentes al ataque de áfidos tienen mayor actividad de PPOs que aquellos susceptibles (Llorente, 2010).

Según Constabel y Barbehenn, 2008, los altos niveles (45%) de proteínas solubles de PPO en *Solanum berthaultii* almacenados en los tricomas glandulares actúan como mecanismo de defensa frente a insectos de tamaño pequeño como áfidos, los cuales desencadenan reacciones de oxidación y polimerización de fenoles que atrapan a otros insectos y que en algunos casos dificultan el ataque por la oclusión de las partes bucales con un polímero pegajoso. Además, la deficiencia de la enzima PPO en las plantas podría relacionarse con la susceptibilidad a la bacteria *Pseudomonas syringae* (Llorente, 2010).

2.3.3 Actividad en los frutos.

El pardeamiento enzimático en las estructuras celulares se relaciona directamente con la oxidación de compuestos fenólicos en presencia de oxígeno (Gil *et al*, 2016). Las PPOs se activan después de una rotura de la integridad de la célula y cuando los contenidos plásmicos y vacuolares se combinan (Liao *et al*, 2006).

Para analizar la estructura y conocer la función biológica de las PPOs, el paso inicial consiste en aislar y purificar ARN de alta calidad y de suficiente rendimiento, que

permita construir la síntesis de ADN complementario (ADNc) y su posterior clonación, secuenciación y caracterización del gen(es) que codifica dicha proteína.

2.4 Extracción de ARN a partir de tejido foliar

La purificación de ARN total en cacao es compleja por ser un tejido altamente recalcitrante, debido al contenido abundante de metabolitos secundarios, polifenoles, carbohidratos y polisacáridos que se precipitan en conjunto con los ácidos nucleicos. Las sustancias fenólicas interactúan irreversiblemente con los ácidos nucleicos y proteínas (Da Silva Gesteira *et al*, 2003), (Chan *et al*, 2007).

La calidad del ARN obtenido por diferentes metodologías (kits comerciales o procedimientos descritos en la literatura) es determinante para la construcción y síntesis de ADN complementario (ADNc).

2.5 Síntesis de ADNc (ADN complementario)

La síntesis de ADNc se basa en el proceso de la transcripción inversa, para lo cual usa una mezcla de ARN total como molde con asistencia de una polimerasa ADN dependiente de ARN. Para la reacción se requiere un cebador (oligo dT) que se unen a la cola de poli (A) del extremo 3' del ARN eucariótico (Devlin, 2006).

2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La molécula del ARN posee una sola hebra y es termolábil por lo que es necesario realizar una transcripción inversa (RT) como paso anterior a la amplificación por PCR, con lo que se genera una hebra adicional al ARN. La nueva hebra es termoestable y es ADN complementario (ADNc). El ARN es copiado a ADNc mediante la enzima transcriptasa inversa (Cortázar & Silva, 2004).

La técnica de la PCR tiene como característica alta sensibilidad lo cual permite la amplificación de un segmento de ADN de interés que se encuentra en bajas cantidades

en miles y millones de veces. Se usa la enzima polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus* (denominada Taq polimerasa) debido a su acción eficiente entre los 70°C y 80°C. (Cortázar & Silva, 2004).

Para llevar a cabo una reacción de PCR se requieren varios elementos como el molde (ADN), dinucleótidos (dATPs, dCTPs, dGTPs, dTTPs), agua, buffer con magnesio, cloruro de magnesio, oligonucleótidos (cebadores o primers en direcciones forward y reverse), Taq polimerasa que a temperaturas distintas cumplen con las etapas de la PCR. Las etapas son desnaturalización, alineación y extensión (Espinosa, 2008).

La selección de oligonucleótidos o primers es parte fundamental para el éxito de un experimento, en especial de un estudio tan novedoso como las polifenol oxidasas.

Los primers son fragmentos complementarios que se unirán a los extremos de la secuencia de ADN de interés y deben cumplir con varios criterios para un experimento como el tamaño el cual debe ser de 18 a 24 nucleótidos, terminación en el extremo 3' que debe ser G o C, contenido de GC del 40-60%, evitar la auto-complementariedad para minimizar la posibilidad de formación de estructuras secundarias, concentración del 0.1-0.5 μ M y similitud con el molde usado (Cortázar & Silva, 2004). Los oligonucleótidos usados en este experimento fueron diseñados en base a un alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas altamente conservadas de polifenol oxidasas de plantas cercanas a la familia botánica de *Theobroma cacao*, disponibles en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Los fragmentos de ADN se separan de acuerdo al peso molecular en geles de agarosa que actúan como tamices moleculares; de esta manera los fragmentos más grandes quedan en el inicio del gel, no así los fragmentos pequeños que migran hacia el otro extremo del gel por influencia de un campo eléctrico. El gel se encuentra inmerso en

una solución de pH 8 dentro de una cámara electroforética cuyo voltaje se aplica a través de electrodos. Posteriormente, los fragmentos o bandas se visualizan con luz UV y se compara su peso con un marcador de peso molecular conocido (Padilla *et al.*, 2006). Tras comprobar el tamaño del amplicón, este se debe extraer del gel y se purifica mediante kits convencionales diseñados específicamente para esta actividad. Posteriormente, los productos purificados son ligados con vectores de clonación.

2.7 Clonación de un gen codificante de PPO

2.7.1 Ligación con T4 ADN ligasa.

La ligación es la formación de un enlace fosfodiéster para unir moléculas de ADN provenientes de diferentes organismos, este ADN resultante se denomina recombinante. La T4 ADN ligasa es una enzima proveniente del bacteriófago T4 que requiere ATP para ejecutar su función de unión entre los extremos 3' y 5' del fragmento de interés con el vector de clonación (Ríos *et al.*, 2004).

2.7.2 Transformación del ADN ligado en células competentes.

La transformación es un proceso en el que las células competentes (presentan alteraciones en la membrana celular) captan ADN libre presente en el medio de cultivo, usualmente plásmidos en forma circular o superenrollada. La transformación se detecta mediante ensayos de complementación alfa (Galván *et al.*, 2006). Una vez que las bacterias han incorporado el inserto, se valida dicha información mediante la extracción y purificación del ADN plasmídico.

Las bacterias competentes presentan una alteración del gen lacZ, lo que indica deficiencia de la actividad β -galactosidasa y que se complementa cuando la bacteria acoge el plásmido que contiene el fragmento del gen lacZ; la compensación de la deficiencia es lo que se denomina complementación α . El éxito de la clonación se

evidencia en el color de las colonias en presencia de X-gal e IPTG. Las colonias azules evidencian la complementación de la deficiencia y las blancas indican la introducción del inserto que interrumpe el fragmento de la β -galactosidasa, por lo tanto no hay complementación.

2.7.3 Extracción ADN plasmídico.

Los plásmidos son moléculas de ADN que no son necesarias para la viabilidad de la bacteria, se replican independientemente del ADN cromosómico bacteriano y son de interés científico para facilitar la clonación de segmentos de interés. Por lo que, para la extracción de ADN plasmídico se escogen los plásmidos que hayan asimilado el segmento de interés (inserto) y se provoca una lisis bacteriana que libere el contenido intracelular para luego visualizarlos mediante corrida electroforética en gel de agarosa (Galván *et al.*, 2006).

2.8 Secuenciación

El orden que tienen los nucleótidos en el ADN es lo que se denomina secuencia. Es un paso importante para el desarrollo de una investigación puesto que conocer el orden de los nucleótidos en un fragmento de interés es lo que diferencia una especie de otra (Márquez *et al.*, 2014)

2.8.1 Técnica de secuenciación Sanger.

Se interrumpe la replicación del ADN *in vitro* para posteriormente realizar una PCR del fragmento que solamente usa un iniciador y dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados radioactivamente y que no poseen el grupo OH del extremo 3'. De manera que al finalizar la amplificación del fragmento, estos se cortan y se obtienen fragmentos de distinta longitud que terminan en ddNTPs que luego se analizan electroforéticamente (Márquez *et al.*, 2014).

El método de Sanger es una técnica ampliamente usada y de confiabilidad por lo que su automatización es un proceso esperado. El método de Sanger se ha optimizado en sus etapas prontas como la PCR, el aislamiento de la polimerasa Taq, el marcaje del ADN y el desarrollo de los secuenciadores automatizados (de Necochea & Canul, 2004).

2.9 Caracterización

La caracterización genética compara las secuencias de interés con otras compiladas en bases de datos como GenBank para determinar si existe relación con otros fragmentos de una especie o entre especies. Las diferencias o similitudes posteriormente se analizan mediante gráficos denominados árboles filogenéticos que determinan la compatibilidad de los genes (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2015).

Materiales y métodos

3.1 Recolección del material vegetal

El material vegetal empleado en este trabajo procede de un ensayo de cacao nacional establecido inicialmente en la Finca La Buseta bajo un proyecto de cooperación entre la United Fruit Company y el gobierno de Ecuador a principios de la década de 1940, ubicada en el Centro de Cacao de Aroma Tenguel (CCAT). Las mazorcas de cacao Nacional procedían de huertas cacaoteras tradicionales del centro y sur del Litoral Ecuatoriano. La selección de las plantas se basó en características sobresalientes a nivel agronómico a partir de árboles productivos y poca incidencia a enfermedades como *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri* (Amores *et al.*, 2009). A partir, de ahí, en el año 2000 se replicó un ensayo clonal en la Finca Experimental La Represa (figura 2), siendo éste el lugar de recolección del material vegetal empleado en ese trabajo.

Se trabajó con tejido foliar proveniente de plantas resistentes (clon L8H12) y susceptibles (clon L44h88) de la finca experimental “La Represa”, en función de los clones reportados como resistentes y susceptibles a monilia y a otras enfermedades, según (Amores *et al.*, 2009) y (Sánchez-Mora *et al.*, 2014).

El material experimental se obtuvo de una parcela con 100 plantas para cada clon de tipo Nacional, distribuidas en dos hileras, en un marco de plantación de 3x3 m, con una densidad poblacional de 1111 plantas/hectárea.

Al momento de la recolección, las hojas se sumergieron en nitrógeno líquido, se las etiquetó y se trasladaron hasta el laboratorio de Biología Molecular, donde se conservaron hasta su uso.

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular adscrito al área de Biotecnología en el Campus “Manuel Haz Álvarez” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicada en Av. Quito km. 11/2 vía a Santo Domingo de los Tsáchilas.

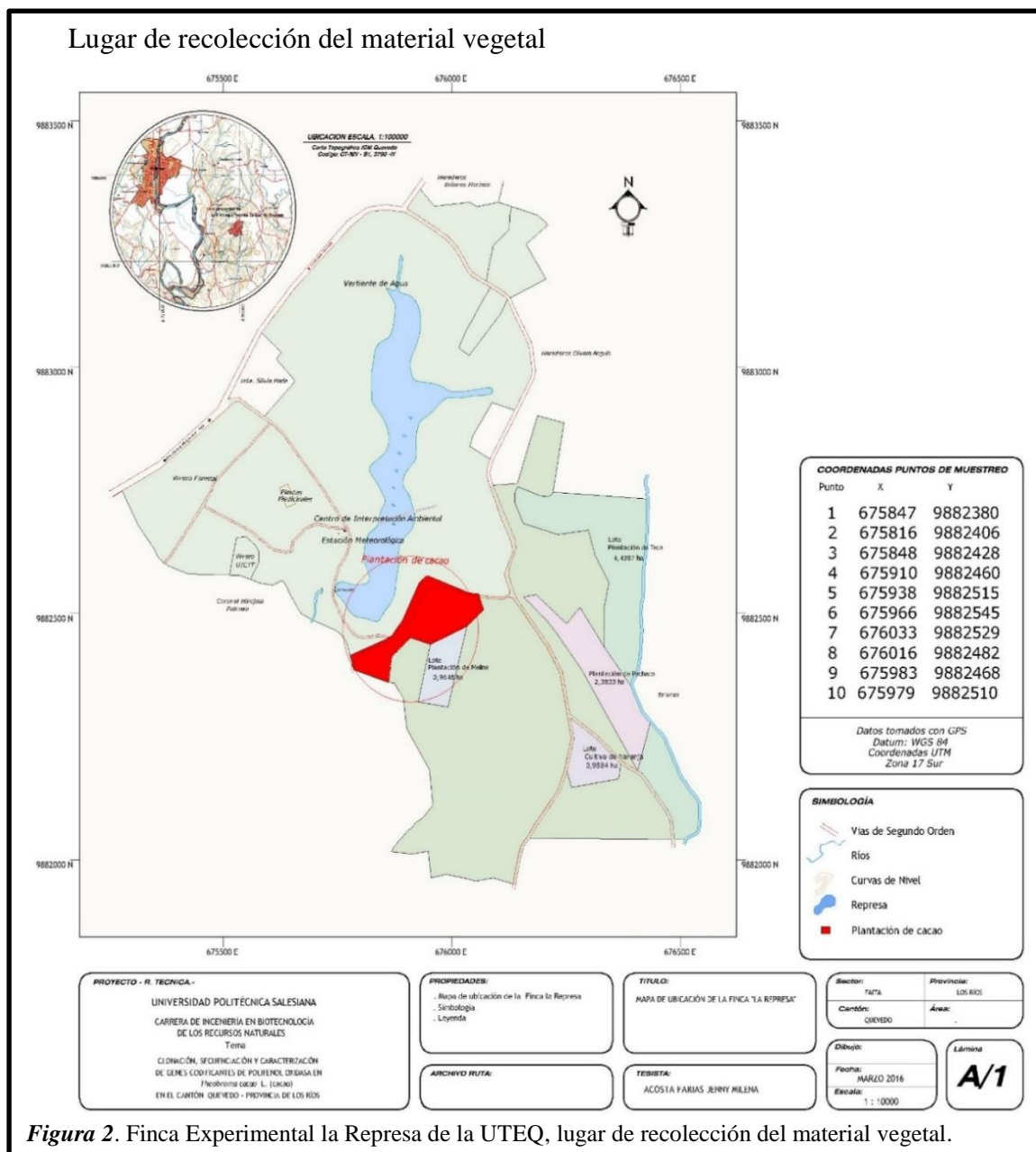


Figura 2. Finca Experimental la Represa de la UTEQ, lugar de recolección del material vegetal.

3.2 Extracción de ADN genómico de cacao

Para validar la eficiencia de los oligonucleótidos e identificar posibles intrones en los productos de amplificación, se realizó la extracción y purificación de ADN genómico de cacao en función de DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen.

A 100 mg de tejido fresco tejido macerado en presencia de nitrógeno líquido se le añadieron 400 μ l de buffer AP1 y 4 μ l de RNase A (100 mg/ml) y se agitó por vórtex. Se incubó la mezcla por 10 minutos a 65°C y se mezcló cada par de minutos, se añadieron 130 μ l de buffer P3 y se incubó por 5 minutos en hielo. Se procedió a centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm para luego pipetear el sobrenadante en una columna de separación QIAshredder. Se centrifugó por 2 minutos a 14000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tupo de 1.5 ml y se añadió 1.5 volúmenes de buffer AW1. Se transfirió la mezcla a una nueva columna de separación y se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm. Se descartó el flujo y se añadieron 500 μ l de buffer AW2 dos veces seguido de centrifugación por 1 minuto a 8000 rpm y por 2 minutos a 14000 rpm. Se transfirió la columna y se diluyó el ADN con buffer TAE.

El ADN genómico extraído se validó posteriormente en geles de agarosa al 1% (p/v) con tinción de bromuro de etidio en tampón de electroforesis TAE 1X.

3.3 Extracción y purificación de ARN total de cacao de alta calidad

3.3.1 Eliminación de ribonucleasas.

Antes de la extracción y purificación del ARN del material vegetal, todos los materiales, soluciones y reactivos se trataron con dietilpírocarbonato (DEPC) a una concentración de 1 ml L⁻¹ de agua. El DEPC es un potente inhibidor de ARNasas empleado en todos los laboratorios del mundo que trabajan con tecnología basada en ARN.

3.3.2 Métodos de extracción de ARN.

3.3.2.1 Método descrito por Chun et al., 2002.

En este método, se detalla un protocolo para la extracción de ARN de alta calidad para frutos de kiwi, manzana, y hojas de durazno que contienen altos niveles de

polisacáridos y compuestos polifenoles, basado en el método del bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

Debido a que los tejidos utilizados por Chun *et al.*, 2002, son muy similares al cacao en cuanto a su recalcitrancia y a su dificultad por aislar ARN de alta calidad, se realizó la extracción de ARN de cacao siguiendo las recomendaciones de los autores con la salvedad de que en lugar de utilizar esferas de zirconio para macerar el tejido, se usó nitrógeno líquido para macerar el tejido.

En una modificación se trabajó con dos muestras de tejido (100 y 300 mg). De allí en adelante, se siguió cuidadosamente cada uno de los pasos descritos por los autores. En una nueva modificación, se trabajó con mayor cantidad de tejido (500- 1000 mg). Además, se añadió tampón de lavado y tampón de extracción a cada muestra, calculando el volumen de cada solución de acuerdo a la cantidad de tejido utilizado a razón de 10 ml de tampón por gramo de tejido.

3.3.2..2 Método descrito por Reid *et al.*, 2006.

Este método, detalla un protocolo optimizado para la extracción de ARN de uva y la determinación estadística de genes de referencia para RT-PCR en tiempo real durante el desarrollo de las bayas.

Al emplear este método para hojas de cacao, no se consiguió extraer ARN total, por tanto, se incluyeron dos modificaciones; primero se incluyó un paso de lavado del tejido según Chun y *et al.*, (2002), este paso es fundamental para eliminar restos celulares y excesiva agua del tejido antes de la extracción. Además, se incrementó la concentración de Tris-HCl de 100 mM a 300 mM en el tampón de extracción.

Posteriormente, en una segunda modificación, las hojas provenientes de plantas sanas y enfermas se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se añadió

buffer de extracción (300Mm Tris-HCl, 25mM EDTA, 2M NaCl, 2% CTAB, 2% PVPP, 0.05% espermidina y 2% mercaptoetanol antes de usar) precalentado a 65°C. La proporción de tejido y buffer de extracción fue de 10 a 12 ml por cada gramo de tejido. El pellet obtenido después de la extracción se precipitó con LiCl 10M.

3.3.3 Tratamiento del ARN con ADNasa.

Para eliminar la presencia del ADN genómico asociado a la extracción de ARN, se empleó la enzima DNase I de Invitrogen, que consiste en la digestión de ADN monocatenario y bicatenario a oligodeoxi-ribonucleótidos con un fosfato en el extremo 5'. Se añadió la muestra de ARN con buffer de reacción, se añadió 1µl de DNase I y se llevó a volumen de 10 µl con agua tratada con DEPC. Tras la adición de los componentes se inactivó la enzima y se incubó a 65°C.

3.4 Síntesis de ADNc (ADN complementario) para ensayos de amplificación por RT-PCR

Para la síntesis de ADNc se usó el juego de reactivos “Super Script III First-Strand Synthesis for RT-PCR” de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Como molde se empleó el ARN total tratado con DNase I para el ensayo de retrotranscripción (RT) (tabla 1).

Tabla 1.

Síntesis de ADNc a partir de ARN total

Componente	Cantidad
ARN	n μ l
50 μ M Oligo (dT)	1 μ l
10 mM dNTP mix	1 μ l
Agua-DEPC	Hasta completar la reacción a 10 μ l

Elaborado por la autora (2017)

El proceso de síntesis de ADNc consiste en la retro-transcripción de ARN en una hebra de ADNc, con lo cual se reduce la inestabilidad térmica de la molécula. Como molde para la reacción se usa una mezcla de ARN en conjunto con una ADN polimerasa dependiente de ARN, que se denomina transcriptasa inversa, que vinculados a un cebador se ligan a la cola de poli (A) del extremo 3'.

A esta mezcla se le añadió la siguiente combinación de reactivos 10x RT Buffer, 25 mM MgCl₂, 0.1 M DTT, RNase OUT y Superscript III RT seguido de incubación a 50°C por 50 minutos, 10 minutos a 25°C y 50 minutos a 50°C. Para terminar los tiempos de incubación se incubó 5 minutos a 85°C para luego reposar en hielo. Por último, se añade 1 μ l de RNase H y se incubó a 37°C por 20 minutos. Se guarda el ADNc sintetizado a -20°C.

3.5 Amplificación por PCR

Para los ensayos de amplificación, se diseñaron tres parejas de oligonucleótidos (Tc-Fw4/Tc-Rev4; Tc-Fw5/Tc-Rev5; Tc-Fw6/Tc-Rev6) a partir de secuencias altamente conservadas de PPOs que fueron probados de manera independiente y combinados

entre ellos para obtener mayor probabilidad de hibridación, empleando ADN genómico como molde. Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados y suministrados por Sigma-Aldrich (tabla 2).

Tabla 2.

Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Oligonucleótido	Temperatura de melting °C	Secuencia (5'-3')
Tc-Fwd4	58.8	AAAGAAGACGGAATTGTTCA
Tc-Fwd5	54.7	GTATTCATGCGTAAAGTAGATC
Tc-Fwd6	56.9	TGGCAGATTTGAACTACTTC
Tc-Rev4	56.9	CCTTCAATTGTTACACTGCT
Tc-Rev5	57.6	GAGGACTCAAATTTGTTTCC
Tc-Rev6	57.8	TCCTTCAATTGTTACACTGC

Elaborado por la autora (2017)

3.5.1 Mix de amplificación para PCR.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo termociclador Peltier-based y las condiciones de amplificación se ajustaron a las temperaturas de melting (T_m) de los oligonucleótidos y a las especificaciones de uso para la enzima Taq DNA Polymerase Recombinant de Invitrogen (tabla 3).

Tabla 3.*Mix para PCR*

Mix de PCR	
Componente	Volumen por reacción
10X PCR buffer Mg	2 ul
50mM MgCl₂	2 ul
10mM mezcla de dNTPs	2 ul
Juego de primers (10 uM)	2 ul c/u
Taq ADN polimerasa	0.5 ul
H₂O milliq	hasta un volumen de 25 ul

Elaborado por la autora (2017)

Las condiciones de amplificación para los oligonucleótidos, se detallan en la tabla 4.

Tabla 4.*Condiciones de amplificación para PCR*

Etapa	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	4 min	1
Desnaturalización	94°C	1 min	40
Unión del cebador	58°C	30 s	
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	7 min	1

Mantenimiento	4 °C	∞	
----------------------	-------------	----------	--

Elaborado por la autora (2017)

3.5.2 Electroforesis de ADN.

La separación y validación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa con tinción de bromuro de etidio. Los geles se prepararon en tampón TAE (tris, acetato de sodio, EDTA) 1X que contiene: 40 mM Tris-base; 1 mM EDTA, 20 mM ácido acético.

3.5.2.1 Análisis de los geles.

Los geles se analizaron con un fotodocumentador (E-Gel Imager, Life Technologies) digital que incorpora un transiluminador ultravioleta UVP y una cámara digital de alta resolución.

3.5.3 Purificación de los fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN amplificados y separados mediante electroforesis se cortaron con un bisturí, evitando la contaminación entre las bandas. Seguidamente, se purificaron con el kit “Purelink Quick Gel Extraction” de Invitrogen de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se disuelve el gel por baño maría a 50 °C con buffer de solubilización (L3) en una proporción de 3:1 (buffer L3: mg del gel) en geles con porcentaje menor o igual al 2% de agarosa. Se incubaron los tubos en baño maría por 10 minutos a 50 °C hasta su disolución y se añadió 1 volumen de isopropanol. En una serie de pasos que consistieron en limpiezas con columnas de separación y centrifugación se purificó el ADN. El producto se almacenó a -20 °C.

3.6 Ligación del ADN para clonación

El inserto/gen amplificado y purificado, se ligó con el vector pCR 2.1 mediante la enzima T4 ADN ligasa, incorporada en el kit “The Original TA Cloning Kit” de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. En la tabla 5 se detalla el mix para la ligación (tabla 5).

Tabla 5.

Mix para ligación

Reactivos	Cantidad
Producto PCR	x µl
5X T4 ADN buffer ligasa de reacción	2 µl
Vector pCR 2.1	2 µl
Agua	A un volumen de 9 µl
ExpressLink T4 ADN ligasa	1 µl

Elaborado por la autora (2017)

Se incubó la reacción de ligación a temperatura ambiente (20-22°C) por un mínimo de 15 minutos.

3.6.1 Transferencia de ADN a *E. coli* mediante transformación.

Las moléculas obtenidas en la ligación se procedieron a transformar en células de *Escherichia coli* quimio-competentes, estirpe DH5α.

3.6.1.1 Transformación de *E. coli* y siembra de colonias.

Para la transformación, se empleó el kit One Shot Transformation Protocol, que incorpora el medio SOC (Super Optimal Colony), un medio usado en el paso final de

la transformación de células bacterianas para obtener mayor eficiencia en la transformación de *E. coli*.

Al momento de la transformación se dispusieron las células en hielo. Se colocaron 2 µl de la reacción de ligación en los viales que contienen las células competentes, se incubaron en hielo por 30 minutos, luego se las sometió a choque térmico por 30 segundos a 42 °C y se las transfirió a hielo. Se añadieron 250 µl de medio SOC a cada vial y se agitaron a 37°C por 1 hora a 225 rpm.

Pasado el tiempo de la incubación, se dispusieron hasta 200 µl de cada transformación a platos de Petri con medio LB (Luria-Bertani), cuyo contenido consta de Bacto triptona, extracto de levadura, cloruro de sodio y bacto agar en agitación a 225 rpm en incubación a 37 °C toda la noche.

3.6.1.2 Análisis de transformantes.

Las células transformadas (con el inserto de interés) se identificaron mediante ensayos de complementación alfa. En este punto, las colonias que incorporaron el inserto fueron de color blanco, mientras que, las que no lograron incorporar el inserto fueron de color azul.

3.6.1.3 Escrutinio de colonias.

Las colonias blancas (que contienen el inserto) se sometieron a ensayos por PCR para la amplificación del fragmento del gen de interés, empleando los primers Tc-Fw6/Tc-Rev4.

Las colonias seleccionadas y comprobadas por PCR se dispusieron a crecimiento en medio LB a 37°C toda la noche.

3.6.1..4 Purificación de ADN plasmídico.

El ADN plasmídico fue purificado mediante el kit PureLink HQ Mini Plasmid Purification, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se tomaron 1-5 ml de los cultivos que se dispusieron toda la noche a crecimiento y se centrifugaron para remover el medio. Se añadieron 250 µl de buffer R3 y 250 µl de buffer L6 y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. La precipitación se realizó añadiendo 350 µl de buffer N4 y se centrifugó por 10 minutos a 12000 x g. Se colocó el sobrenadante en la columna y se añadieron 500 µl de buffer de lavado W10 con etanol. Se incubó por un minuto a temperatura ambiente. Se añadieron 700 µl de buffer W9 con etanol a la columna. Se colocó la columna en la centrífuga a 12000 x g por 1 minuto y se removió el etanol. Al final se resuspendió el ADN plasmídico en buffer TE. La comprobación de la purificación del ADN se realizó por electroforesis horizontal.

3.7 Secuenciación de ADN

La secuenciación de los fragmentos de interés se llevó a cabo en un secuenciador tipo Li-cor 4300 DNA Analyzer que funciona con el método de Sanger, que pertenece al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Quevedo. Las secuencias de ADN se obtuvieron mediante hibridación con los oligonucleótidos universales M13 forward y M13 reverse (anexo 9). Se secuenció 1 µg de ADN plasmídico en un volumen de 15 µl de cada muestra. Se realizó el ensamblaje de secuencias eliminando cincuenta nucleótidos del extremo 3' en dirección forward y del 5' en dirección reverse.

3.8 Caracterización de un gen codificante de polifenol oxidasa (PPO)

Se utilizó el programa Bio-Edit (USA) para la edición de secuencias y construcción de alineamientos. Para comparar nuestras secuencias contra secuencias de bases de datos públicas se utilizó el programa BLASTX (Altschul *et al.*, 1990), que compara el porcentaje de similitud con otras secuencias de PPOs y se trabaja con el electroferograma proveniente del equipo secuenciador. El alineamiento de secuencias se realizó en el programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1997) disponible on-line en la página web del European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk).

Para la búsqueda y comparación de secuencias de interés se accedió a la base de datos pública NCBI (National Center for Biotechnology Information) y para el alineamiento y traducción de secuencias de ADN a proteínas se accedió a ExPASy (Expert Protein Analysis System).

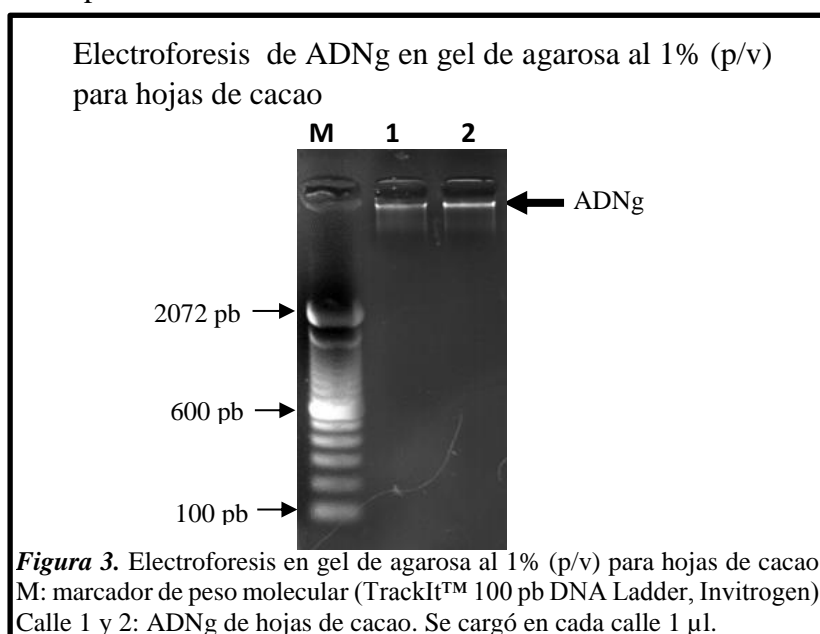
Se realizó el ensamblaje de secuencias eliminando aproximadamente cincuenta nucleótidos del extremo 3' en dirección Forward y del extremo 5' en dirección Reverse.

Resultados y discusión

4.1 Extracción de ADN genómico de cacao

El método empleado en la extracción de ADNg fue eficiente y se empleó para comprobar la eficiencia de los oligonucleótidos y para determinar la presencia de posibles intrones al compararlo con productos de amplificación con ADNc. El ADNg (ADN genómico) extraído se validó posteriormente en geles de agarosa al 1% (p/v) con tinción de bromuro de etidio en tampón de electroforesis TAE 1X (figura 3).

El ADN de cacao no mostró intrones al ser comparado con ADNc en un ensayo de amplificación por PCR.



4.2 Extracción de ARN total de cacao

La extracción de ARN total de alta calidad en plantas presenta una serie de dificultades, su obtención es determinante para subsecuentes ensayos moleculares como síntesis de ADN complementario (ADNc) mediado por retrotranscriptasa (RT), amplificación por PCR (Birtic & Kranner, 2006), (Islas-Flores *et al.*, 2006), amplificación rápida de ADN complementario final (Portillo *et al.*, 2006) y (Shi & Bressan, 2006); pasos previos e imprescindibles para la clonación, secuenciación y caracterización de un gen codificante de polifenol oxidasa (PPO) de cacao.

Por otra parte, hasta la fecha no existen métodos comerciales eficientes y que de algún modo garanticen al investigador un óptimo resultado en la extracción y purificación de ARN total en plantas de origen tropical. Así mismo, la extracción de ARN de tejidos de plantas recalcitrantes conlleva una serie de problemas por la presencia de pectinas, taninos (M.E., 1992), pigmentos (Kim & Hamada, 2005), polisacáridos (Manickavelu *et al.*, 2007), poliquinonas (Meisel *et al.*, 2005) y otros metabolitos secundarios (de Keukeleire *et al.*, 2006). Todos estos componentes vegetales pueden interactuar con los ácidos nucleicos, concretamente con el ARN formando complejos insolubles. Esta interferencia química puede causar degradación y bajos rendimientos de ARN mensajeros (ARNm) como un mecanismo de oxidación de polifenoles y coprecipitación con polisacáridos (Wang *et al.*, 2000) y (Morante-Carriel *et al.*, 2014).

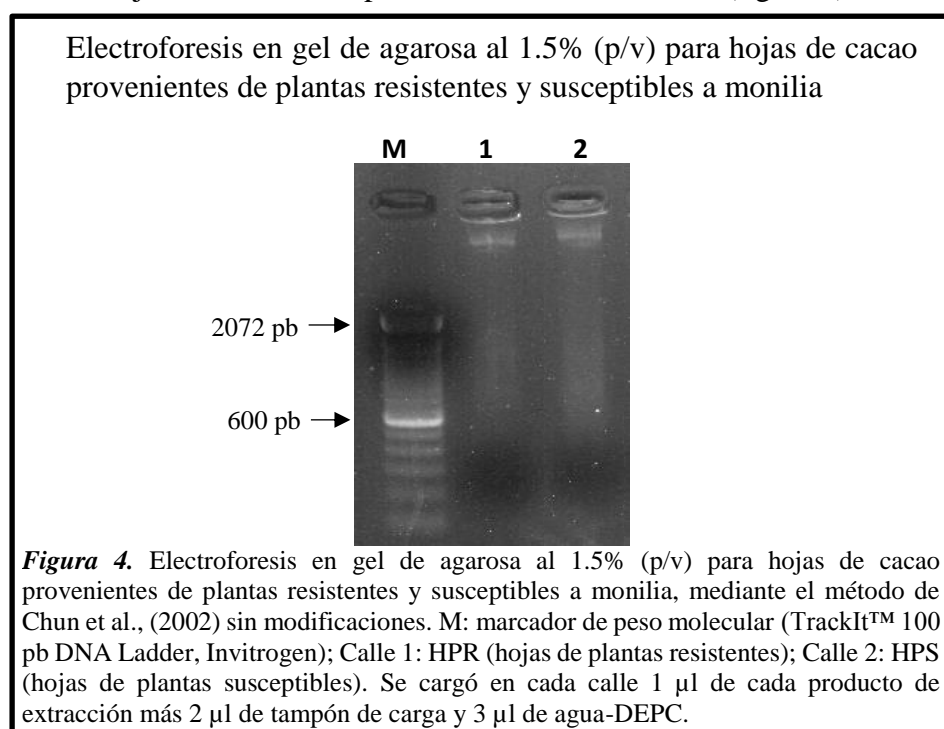
Algunos de los protocolos descritos para la extracción de ARN de plantas ricas en polisacáridos y compuestos polifenólicos incluyen el uso de pirrolidona y precipitación con etanol, sin embargo, el uso de este reactivo no siempre se convierte en un beneficio para el investigador (Morante-Carriel *et al.*, 2014). La dificultad de extraer ARN de estos tejidos con los métodos convencionales ya descritos, por lo general siempre requiere incluir modificaciones, optimizando procedimientos específicos para ciertos tejidos vegetales. Las modificaciones descritas en este protocolo permitieron la extracción y purificación de ARN de cacao, con suficiente pureza y calidad, que se espera funcione en otras plantas de similares características (anexo 6).

La extracción de ARN de cacao supone un desafío importante para la investigación debido a la complejidad y recalcitrancia del tejido foliar, por lo que fue necesario incluir varias modificaciones a los dos métodos de extracción descritos por Chun *et al.*, (2002) y Reid *et al.*, (2006), respectivamente, utilizados en esta investigación para

conseguir el alto grado de pureza de ARN total imprescindible para la síntesis de ADNc.

4.2.1 Método descrito por Chun et al., (2002).

Aunque este método ha sido eficientemente desarrollado para frutos de kiwi, manzana y hojas de durazno con altos niveles de polisacáridos y polifenoles, su aplicación en tejidos de cacao no permitió obtener ARN total (figura 4).



Vista la importancia de este método en los tejidos descritos en el párrafo anterior, se incluyeron modificaciones puntuales, sin embargo, tampoco se logró obtener ARN de cacao (figura 5).

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) para hojas de cacao provenientes de plantas resistentes y susceptibles a monilia

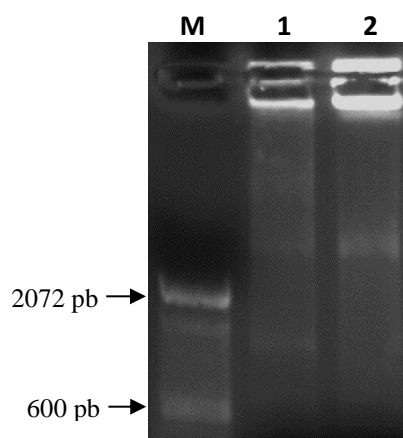


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) para hojas de plantas resistentes y susceptibles a monilia, usando el método de Chun et al., (2002) con modificaciones. M: marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA Ladder, Invitrogen), calle 1: HPR (hojas de plantas resistentes), calle 2: HPS (hojas de plantas susceptibles). Se cargó en cada calle 1 μ l de cada producto de extracción más 2 μ l de tampón de carga de ARN y 3 μ l de agua-DEPC.

4.2.2 Método descrito por Reid et al., (2006)

Reid y su grupo de colaboradores en 2006 lograron desarrollar un protocolo para tejidos de uvas, cuyo contenido de polifenoles y polisacáridos es alto y presenta muchos cambios durante su desarrollo. Sin embargo, la aplicación del protocolo en hojas de cacao no dio los resultados esperados (figura 6).

Al incluir modificaciones a lo largo del protocolo original se consiguió obtener ARN total de calidad para hojas de cacao. Por tanto, de los dos métodos empleados en esta investigación, únicamente el método descrito por Reid *et al.*, (2006) con modificaciones, permitió optimizar un protocolo para la extracción y purificación de ARN total de calidad para hojas de cacao. A continuación se detalla cada uno de los pasos del protocolo optimizado en este trabajo.

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) para hojas de cacao provenientes de plantas resistentes y susceptibles a monilia

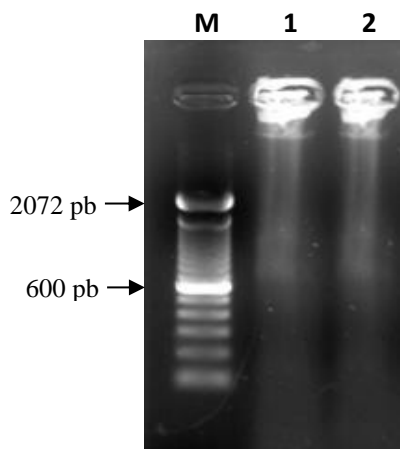


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) para hojas de plantas resistentes y susceptibles a monilia, usando el método de Reid et al., (2006) sin modificaciones. M: marcador de peso molecular (TrackIt™ 100 pb DNA Ladder, Invitrogen), calle 1: HPR (hojas de plantas resistentes), calle 2: HPS (hojas de plantas susceptibles). Se cargó en cada calle 1 µl de cada producto de extracción más 2 µl de tampón de carga de ARN y 3 µl de agua-DEPC.

4.2.3 Protocolo optimizado para la extracción de ARN total de cacao.

4.2.3..1 Fragmentación de la muestra.

Las hojas se fragmentaron en un mortero en presencia de Nitrógeno líquido, hasta conseguir un polvo muy fino. Después de la maceración, el tejido se colocó en tubos Falcon de 50 ml y se almacenó nuevamente en Nitrógeno líquido para evitar la degradación del ARN por ARNasas activas.

4.2.3..2 Extracción.

Para la extracción del ARN, se añadieron 12 ml de buffer de extracción (300mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 2M NaCl, 2% CTAB, 2% PVPP, 0.05% espermidina y 2% mercaptoetanol justo antes de usar) precalentado a 65°C por cada gramo de tejido macerado. A continuación, el tejido se homogenizó por vórtex durante un minuto y se incubó a 65°C durante 10 minutos, con agitación leve cada dos minutos. Después de la incubación, se añadió un volumen igual (12 ml) de cloroformo-isoamilalcohol (24:1 v/v), se homogenizó nuevamente por vórtex durante 1 minuto hasta conseguir una

emulsión y se separaron las fases por centrifugación a 3500 x g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se volvió a re-extraer con un volumen igual de cloroformo-isoamilalcohol (24:1 v/v) a 17200 x g por 35 minutos a 4°C. Nuevamente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se añadió 0.1 vol 3M NaOAc (pH 5.2) y 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico frío. A continuación, se homogenizó por vórtex y se conservó a -40°C por una hora. Consecutivamente se centrifugó a 17200 x g por 40 minutos a 4°C.

4.2.3.3 Precipitación.

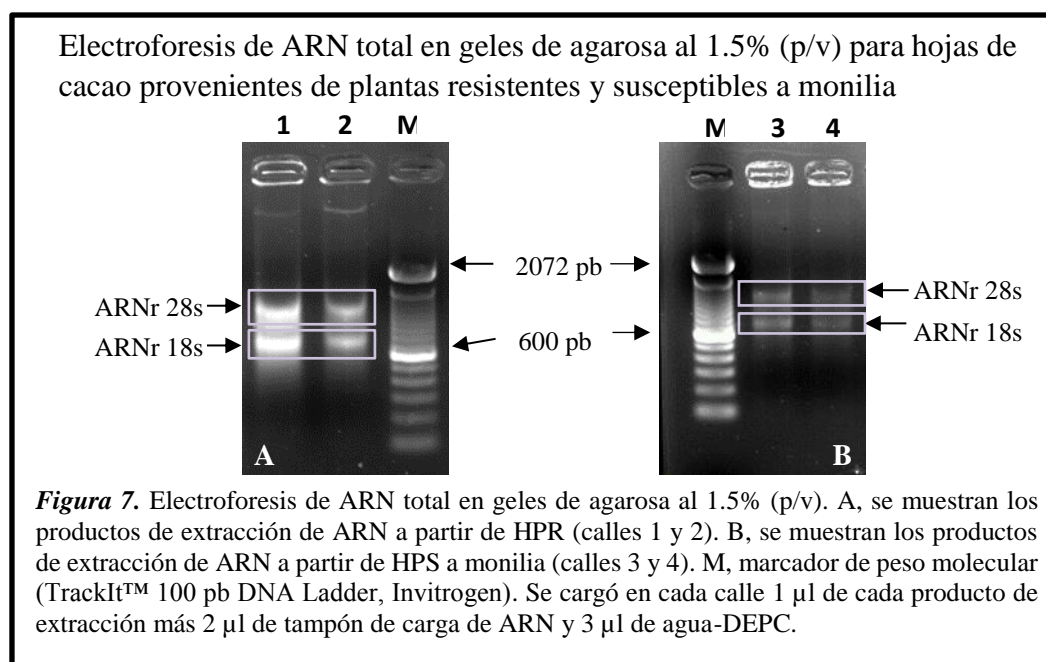
El pellet resultante de la extracción se disolvió en 1 ml de agua-DEPC, se añadió 0.3 vol de LiCl 10 M y se incubó a -20°C durante 4 horas. Posteriormente se centrifugó a 17200 x g por 40 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante.

4.2.3.4 Elución.

El pellet de ARN se lavó con 1 ml de etanol frío al 70%, se dejó secar en la campana de flujo laminar durante 10 minutos y posteriormente se resuspendió en 40 µl de agua tratada con DEPC. Una parte de los productos de extracción fueron visualizados mediante electroforesis horizontal. El resto de producto se almacenó a -40°C.

4.2.4 Electroforesis de ARN.

El ARN total extraído se validó posteriormente en geles de agarosa al 1.5% (p/v) teñido de bromuro de etidio en tampón de electroforesis TAE al 1x (Figura 7A y 7B).



4.2.5 Cuantificación del ARN.

La cuantificación del ARN se realizó mediante espectrofotometría. Los valores de absorbancias fueron obtenidos a longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm. Para comprobar los niveles de pureza del ARN obtenido, se realizaron relaciones de observancia. La relación 260/280 evidenció la ausencia de proteínas contaminantes en los productos de extracción, cuyo rango estuvo comprendido entre 1,8-2. La relación 260/230, mostro un bajo nivel de contaminación por polisacáridos, carbohidratos y compuestos fenólico, cuyo rango fue ≥ 2 .

Tabla 6.

Cuantificación de ARN total por espectrofotometría

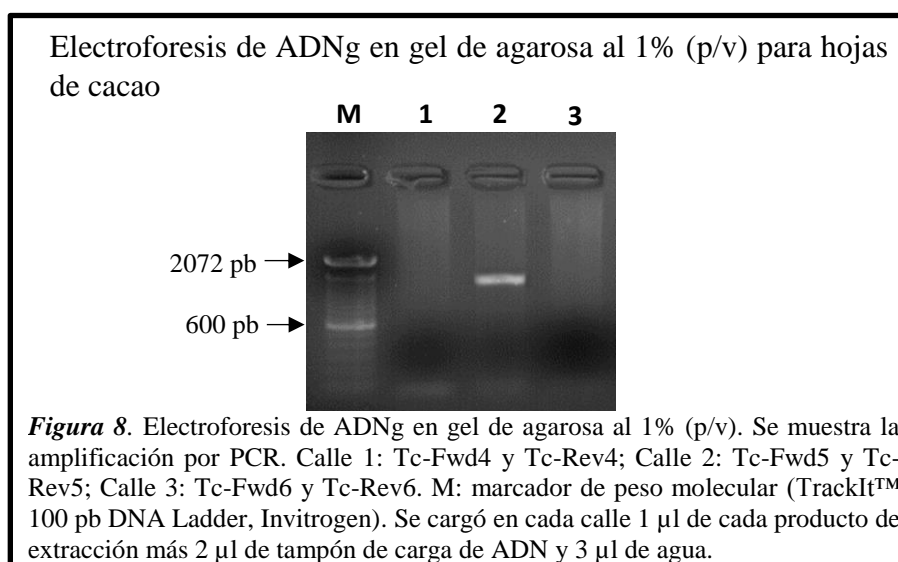
Gel	Rendimiento ug g ⁻¹	A260/280	A260/230	Calidad
Calle 1	225	1,95	2.25	Excelente
Calle 2	153	1.90	2.18	Muy buena
Calle 3	348	1,82	2.05	Buena
Calle 4	269	1.80	2.00	Buena

Elaborado por la autora (2017)

4.3 Amplificación de un gen codificante de polifenol oxidasa de cacao

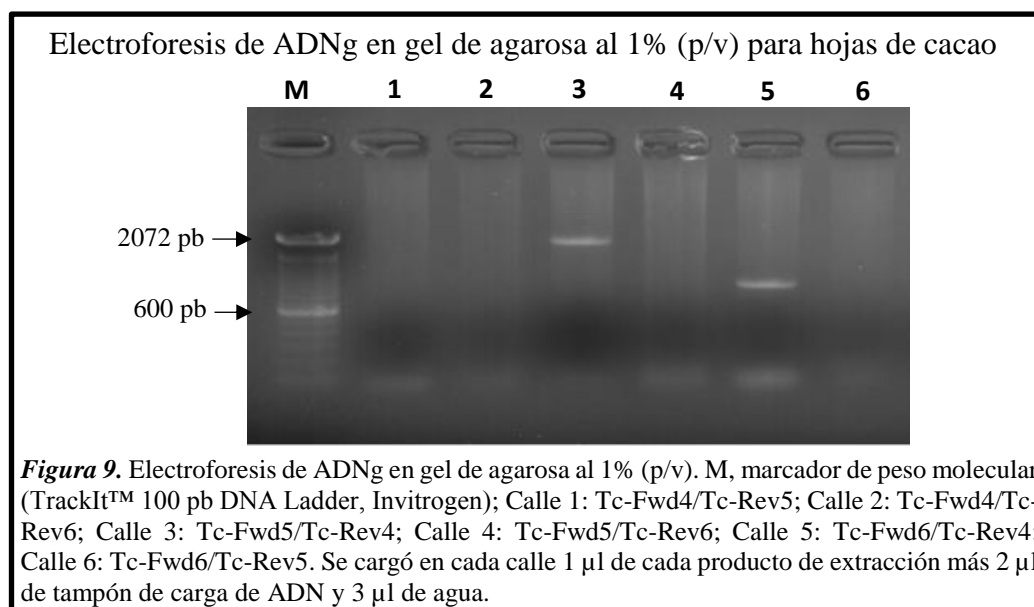
Los ensayos de amplificación se realizaron con oligonucleótidos diseñados a partir del alineamiento múltiple de secuencias predictivas de PPOs en plantas, disponibles en GenBank. De manera específica se favoreció a aquellas secuencias nucleotídicas de PPOs cercanas a la familia botánica del *Theobroma cacao* L.

De modo que se probaron tres parejas de oligonucleótidos (Tc-Fwd4/ Tc-Rev4; Tc-Fwd5/ Tc-Rev5; Tc-Fwd6/ Tc-Rev6) de manera independiente, usando ADNg como molde para comprobar la eficiencia de los oligonucleótidos (Figura 8).



El gel de electroforesis usando ADNg como molde muestra la ausencia de productos de amplificación por PCR en las calles 1 y 3, a diferencia de la calle 2.

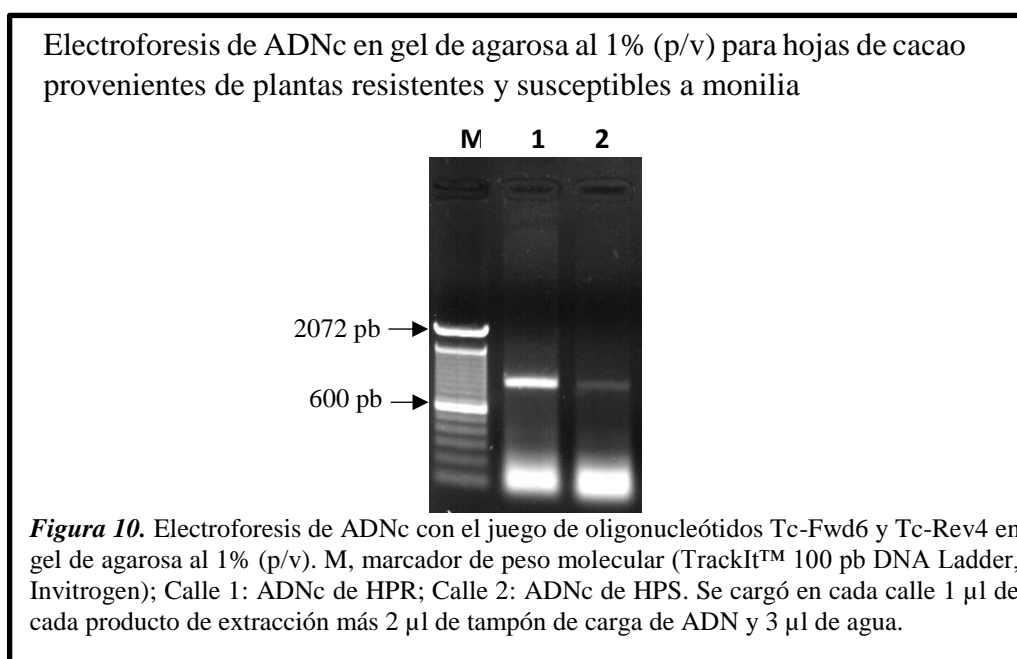
Como estrategia para aumentar la capacidad de hibridación, se probaron varias mixturas de oligonucleótidos; Tc-Fwd4/ Tc-Rev5; Tc-Fwd4/ Tc-Rev6; Tc-Fwd5/ Tc-Rev4; Tc-Fwd5/ Tc-Rev6; Tc-Fwd6/ Tc-Rev4; Tc-Fwd6/ Tc-Rev5 (Figura 9).



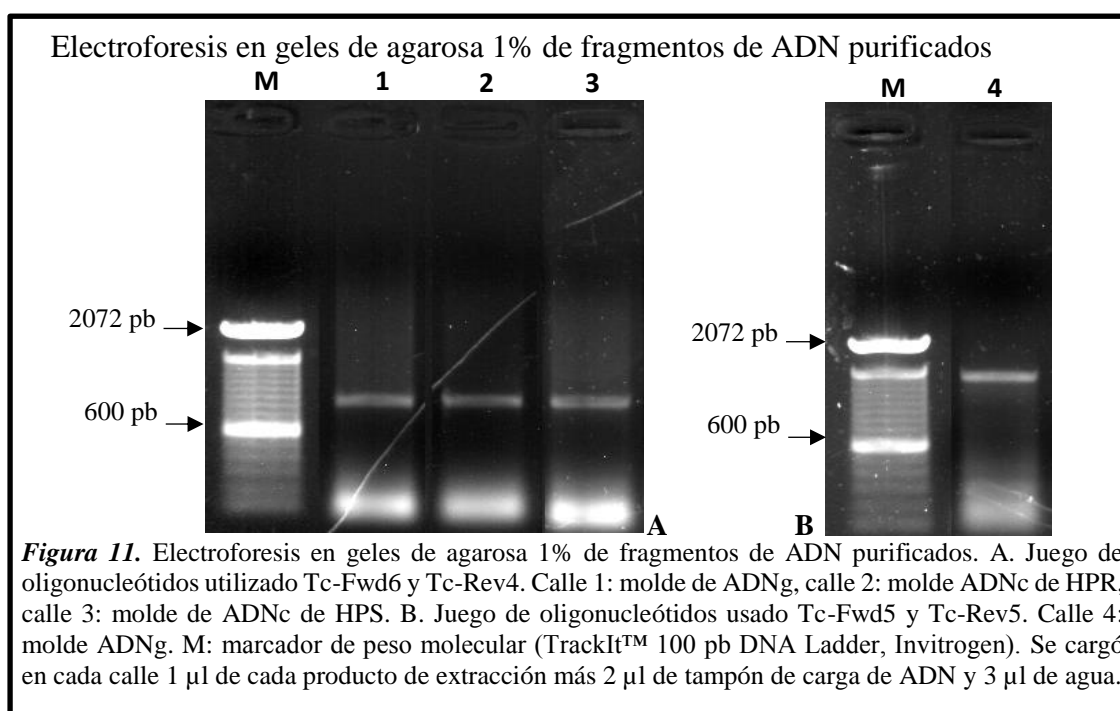
La banda que aparece en la calle 3, se debe a una hibridación inespecífica de los oligonucleótidos Tc-Fwd5/Tc-Rev4 con el ADNg. Por su parte, la banda en la calle 5 coincide con el tamaño teórico esperado (961 pb).

Es notable mencionar que en los últimos años han aparecido en el mercado juegos de reactivos para la síntesis de ADNc para RT-PCR. El kit “SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR” de Invitrogen fue usado para la investigación, cuyas reacciones de ADNc fueron utilizadas para los siguientes ensayos de amplificación de secuencias codificantes de PPOs por PCR.

Únicamente los oligonucleótidos (Tc-Fw5/Tc-Rev5; Tc-Fw6/Tc-Rev4) que hibridaron con el ADN genómico se emplearon en ensayos de amplificación con ADNc, siendo la pareja de oligonucleótidos Tc-Fw6/Tc-Rev4, la que hibridó de manera específica con el ADNc, obteniéndose un fragmento de 1000 pares de bases (figura 10).



Los fragmentos de ADN amplificados y separados por electroforesis, se recortaron en un transiluminador con luz ultravioleta y se purificaron con el juego de reactivos “Purelink Quick Gel Extraction” de Invitrogen, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se comprobaron los productos en geles de agarosa al 1% (p/v) (figura 11).



En los carriles 1, 2 y 3 se evidencian bandas de similares pares de bases, provenientes de hoja de planta resistente y susceptible a monilia. La calle 1 muestra la amplificación de ADN_g, en contraste con las calles verdes 2 y 3 provenientes de tejido sano y enfermo, respectivamente.

4.4 Ligación del ADN con el vector de clonación y transformación en células competentes

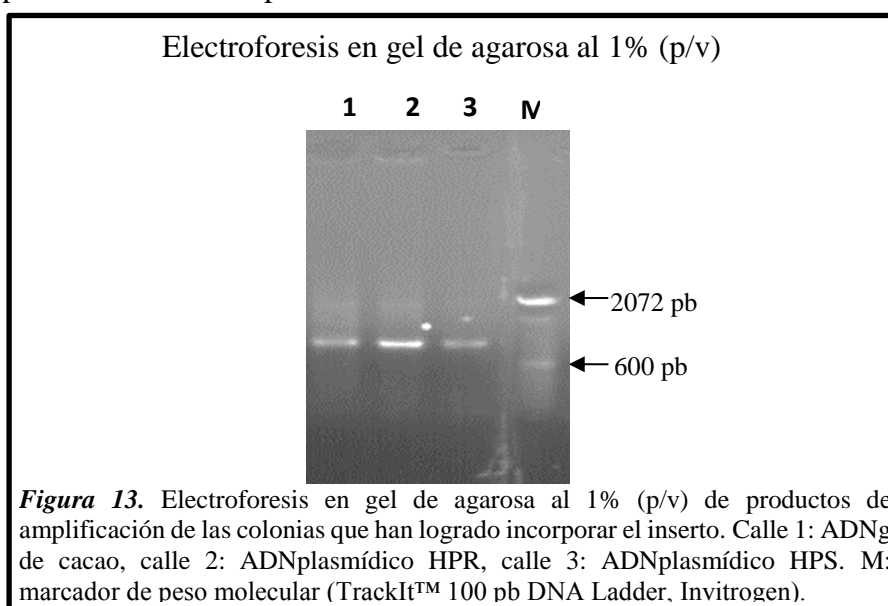
Los fragmentos purificados se ligaron con el vector pCR 2.1 y se transformaron en células competentes de *Escherichia coli* DH5α, con el kit “The Original TA Cloning Kit”, que luego se seleccionaron mediante ensayos de “complementación α”.

Las células que se transformaron con el kit “One Shot Transformation Protocol” fueron dispuestas en placas de Petri conteniendo medio LB (Luria Bertani) con IPTG, X-Gal

y ampicilina debido al gen de resistencia al antibiótico que tienen incorporado las células transformadas. Las colonias de *E. coli* crecieron y adoptaron los colores azul o blanco, siendo las blancas las que incorporaron el inserto a su genoma (figura 12).



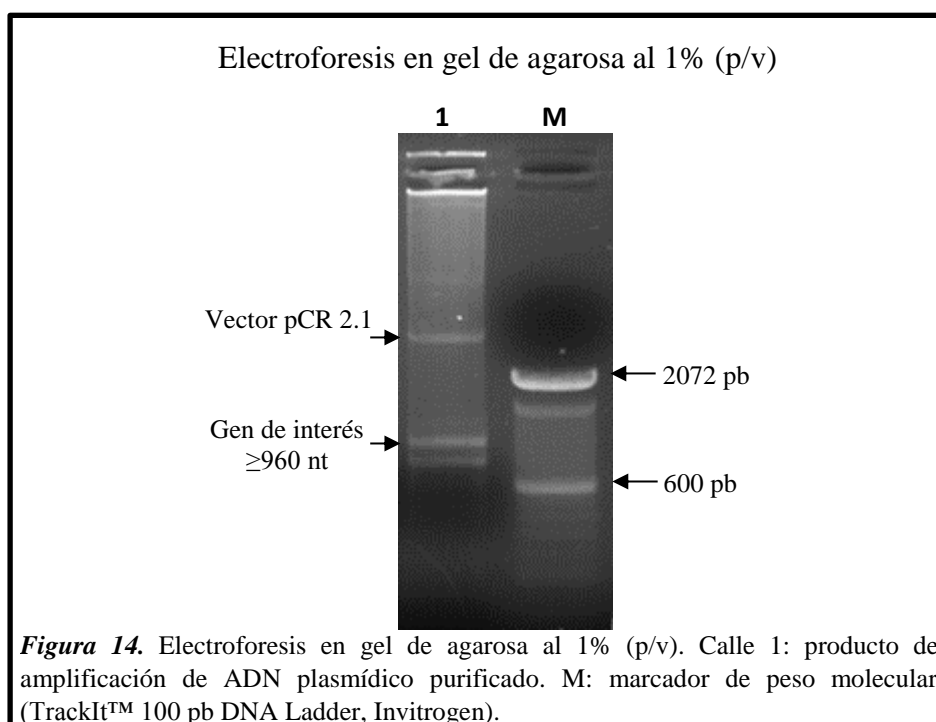
Posteriormente, las colonias blancas de *E. coli* se sometieron a escrutinio mediante PCR (figura 13). Las bandas presentes en el gel corresponden a los productos amplificados de clones positivos.



Una vez comprobado el inserto, las colonias transformadas se dispusieron en medio LB y se crecieron en agitación a 225 rpm, 37°C por 24 horas.

4.5 Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se purificó con el kit PureLink HQ Mini Plasmid Purification Kit. Las secuencias generadas con el vector de clonación sirvieron para la posterior secuenciación, mediante el uso de los primers M13 Forward y M13 Reverse. La eficiencia de la extracción de ADN plasmídico se verificó por amplificación por PCR con el juego de primers Tc-Fw6/Tc-Rev4 y se visualizó mediante electroforesis horizontal, en el cual aparece una banda de aproximadamente 3000 pb, que indica presencia de residuos, y el gen de interés que coincide con el producto amplificado 961 pb (Figura 14).



4.6 Secuenciación de ADN

Se ha descrito la existencia de familias multigénicas que codifican diferentes PPOs en diferentes especies de plantas; como por ejemplo, tomate (Newman *et al.*, 1993), papa (Thygesen *et al.*, 2004), plátano (Gooding *et al.*, 2001), álamo (Wang & Constabel, 2004) y algunas Rosáceas (Haruta *et al.*, 1999). Además, (Kim *et al.*, 2001) han descrito la expresión simultánea de dos o más genes en un mismo estado de desarrollo, y utilizando un anticuerpo anti-PPO de manzana, (Haruta *et al.*, 1999) han descrito la

presencia de varias bandas de proteína de peso molecular entre 55 a 66 kDa de frutos y hojas de diversas rosáceas, incluyendo manzana, pera, membrillo y melocotón, aun cuando no todas las especies mencionadas tienen el genoma secuenciado. El genoma de cacao se encuentra secuenciado hace ya varios años pero no se ha descrito ninguna PPOs hasta el momento. Sin embargo, el método de secuenciación utilizado en este trabajo permitió obtener la secuencia completa del fragmento clonado (Figura 15).

Secuencia del gen PPO1-Tc

```
CTAGCTATGGCTTCTCCTGTCCTGCCGTCATCAACCCCAACCACTATTTCCAGCTCCCCCATTC
AAACTTCCTTCTTTTCCAAAAACATGTCAACTTTTCTTGAATAAGAAGATCAAAAAGCCAGACTA
CTCCGGCCCCAAGTAAAGTAGTGTCATGCAAAGCCACGAACAATGGGAGCAAAGGAGACTCTTCT
CTCAACAGGTTTGATAGAAGGGATCTCCTGATTGGGCTAGGAGGTCTCTACGGGGCAACCATCC
TTTCCAATGACCCATTTGCATTAGCAGCACCTATTGCCGCTCCTGATTTGACCCTTTGCGGTGA
TGCAACAATATCAGACACAACAAAAGAGACAGTCTATTGCTGCCCACCAGAAACGACAAAGGTC
ATAGATTTCAAACCACCTACATATTCCAAGATACGCTATAGGTCTGCTGCACATTTAGTTGATC
CTGACTACTTGGCTAAATTTACCAAGGCCATGGAGCTCATGAGAGCTCTTCCTGATGATGATCC
ACGTAGTTTCAAGCAACAAGCAAATATTCATTGTGCTTATTGTAACGGGGCTTATGATCAAGTA
GGGTTTGATCAAGATATTCAAGTTCATTTCTCGTGGCTCTTTTTCCCATTCATAGGTTGTATC
TTTATTTCTATGAAAGGATTTTGGGCAAGCTGATTGGTGACCCGGATTTGCCATGCCATTTTG
GAAGTGGGATGCCCCTGCAGGCATGCCCATACCTGCCATATATGTAAACCTAACTCTCCACTC
TACGATGACAAGCGCAATGTTAACCATCAGGCACCAAAGGTCGCTGATCTTGATTACAATGGCA
CTGATAAAGATATAACAGACACAGCAATGGTACAAAGTAATCTCAAGGTCATGTACAAGCAGAT
GGTGTCTGGTTCAAAGACGGCTTCTCTTTTCCATGGAAAGGTGTACCGTGCTGGCGATAAACC
A
```

Figura 15. Secuencia del gen PPO1-Tc identificado en este trabajo. La secuencia consta de 961 nt

4.7 Caracterización del gen PPO1-Tc

El gen PPO1-Tc se caracterizó mediante el uso de herramientas bioinformáticas disponibles en NCBI (National Center for Biotechnology Information) y en EBI (European Bioinformatics Institute). La secuencia nucleotídica del gen PPO1-Tc codifica para una proteína de 317 aminoácidos (Figura 16).

Aminoácidos codificados por el gen PPO1-Tc

```
MASPVLPSSPTTISSSPIQTSFFPKTCQLFLNKKIKKPDYSGPSKVVSCKATNNGSKGDSSLNRF
DRRDLLIGLGLYGATILSNDFALAAPIAAPDLTLCGDATISDTTKETVYCCPPETTKVIDFKPP
TYSKIRYRSAAHLVDPDYLAKEFTKAMELMRALPDDDPFSFKQQANIHCAYCNGAYDQVGFQDIQV
HFSWLFFPFHRLYLYFYERILGKLIGDPDFAMPFWNWDAPAGMPIPAIYVNPNSPLYDDKRVNHNQ
APKVADLDYNGTDKIDITDTAMVQSNLKVMYKQMVSGSKTASLFHGKVYRAGDKP
```

Figura 16. Aminoácidos codificados por el gen PPO1-Tc

Para comprobar la similitud/identidad del gen obtenido en este trabajo se realizó una búsqueda aleatoria mediante Blastn disponible en NCBI, la cual muestra que el gen

denominado PPO1-Tc tiene una similitud cercana al 100% a la secuencia predictiva de PPO de *Theobroma cacao* depositada en NCBI (XP_017978715.1). Este gen también fue similar a otras PPOs predictivas de cacao y similar en un 70% a la PPO predictiva de algodón (Tabla 7).

Tabla 7.

Máximo parentesco molecular de la proteína PPO1-Tc con otras PPOs provenientes de plantas

Id Gen	Similitud	Identidad	Acc. NCBI
PPO1-Tc	PREDICTED: polyphenol oxidase, chloroplastic [Theobroma cacao]	99%	XP_017978715.1
	Larreatricin hydroxylase isoform 1 [Theobroma cacao]	98%	EOY28328.1
	Larreatricin hydroxylase isoform 2 [Theobroma cacao]	98%	EOY28329.1
	Larreatricin hydroxylase [Theobroma cacao]	79%	EOY28325.1
	PREDICTED: polyphenol oxidase I, chloroplastic [Theobroma cacao]	79%	XP_017978713.1
	PREDICTED: polyphenol oxidase, chloroplastic-like [Gossypium raimondii]	70%	XP_012451640.1

Elaborado por la autora (2017)

Para comprobar el máximo parentesco molecular con otras PPOs de plantas cercanas a la familia botánica del cacao, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas con las secuencias predictivas de PPOs de cacao depositadas en NCBI, con el fin de comprobar la correspondencia y posición según su ORF (open reading frames, en español marco abierto de lectura), según el programa MUSCLE, versión 3.8, disponible en el sitio web del EBI.

Este alineamiento permitió caracterizar de forma molecular al gen identificado en esta tesis, el cual presentó similitud entre los aminoácidos que ocupan una posición concreta en la secuencia. Sin embargo, las diferencias puntuales pueden deberse a polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), ya que estas sustituciones pueden ser el resultado de la sustitución de una sola base en los respectivos codones. Estos cambios

son posibles porque el material vegetal usado para secuenciar el genoma de cacao tiene múltiples orígenes (Ecuador, Costa de Marfil, entre otros), siendo diferentes al tejido empleado en el presente trabajo (hoja de cacao Nacional), recolectados de la Finca Experimental la Represa en Quevedo, Ecuador. Los aminoácidos codificados por el gen PPO1-Tc, ocupan la posición que aparece sombreada y cabe mencionar que la M (metionina) representa el codón de inicio de la proteína (Figura 17).

Tripletas codificadas para aminoácidos

```

1   S Y G F S C P A V I N P N H Y F Q L P H
1   * L W L L L S C R H Q P Q P L F P A P P
1   L A M A S P V L P S S T P T T I S S S P
1   CTAGCTATGGCTTCTCCTGTCCTGCCGTCATCAACCCCAACCACTATTTCCAGCTCCCC
1           10           20           30           40           50
   GATCGATACCGAAGAGGACAGGACGGCAGTAGTTGGGGTTGGTGATAAAGGTCGAGGGG

21  S N F L L S K N M S T F L E * E D Q K A
21  F K L P S F Q K H V N F S * I R R S K S
21  I Q T S F F P K T C Q L F L N K K I K K
61  ATTCAAACTTCCTTCTTTCCAAAAACATGTCAACTTTTCTTGAATAAGAAGATCAAAAAG
61           70           80           90           100          110
61  TAAGTTTGAAGGAAGAAAGGTTTTTGTACAGTTGAAAAGAACTTATTCTTCTAGTTTTTC

41  R L L R P K * S S V M Q S H E Q W E Q R
41  Q T T P A Q V K * C H A K P R T M G A K
41  P D Y S G P S K V V S C K A T N N G S K
121 CCAGACTACTCCGGCCCAAGTAAAGTAGTGTCATGCAAAGCCACGAACAATGGGAGCAAA
121           130          140          150          160          170
121 GGTCTGATGAGGCCGGGTTTCATTTTCATCACAGTACGTTTCGGTGCTTGTTACCCTCGTTT

61  R L F S Q Q V * * K G S P D W A R R S L
61  E T L L S T G L I E G I S * L G * E V S
61  G D S S L N R F D R R D L L I G L G G L
181 GGAGACTCTTCTCTCAACAGGTTTGATAGAAGGGATCTCCTGATTGGGCTAGGAGGTCTC
181           190          200          210          220          230
181 CCTCTGAGAAGAGAGTTGTCCAAACTATCTTCCCTAGAGGACTAACCCGATCCTCCAGAG

81  R G N H P F Q * P I C I S S T Y C R S *
81  T G Q P S F P M T H L H * Q H L L P L L
81  Y G A T I L S N D P F A L A A P I A A P
241 TACGGGGCAACCATCCTTTCCAATGACCCATTTGCATTAGCAGCACCTATTGCCGCTCCT
241           250          260          270          280          290
241 ATGCCCCGTTGGTAGGAAAGGTTACTGGGTAAACGTAATCGTCGTGGATAACGGCGAGGA

101 F D P L R * C N N I R H N K R D S L L L
101 I * P F A V M Q Q Y Q T Q Q K R Q S I A
101 D L T L C G D A T I S D T T K E T V Y C
301 GATTTGACCCTTTGCGGTGATGCAACAATATCAGACACAACAAAAGAGACAGTCTATTGC
301           310          320          330          340          350
301 CTAAACTGGGAAACGCCACTACGTTGTTATAGTCTGTGTTGTTTCTCTGTCAGATAACG

121 P T R N D K G H R F Q T T Y I F Q D T L
121 A H Q K R Q R S * I S N H L H I P R Y A
121 C P P E T T K V I D F K P P T Y S K I R

```


361 TGCCACACCAGAAACGACAAAGGTCATAGATTTCAAACCACCTACATATTCCAAGATACGC
 361 370 380 390 400 410
 361 ACGGGTGGTCTTTTGCTGTTTCCAGTATCTAAAGTTTGGTGGATGTATAAGGTTCTATGCG

 141 * V C C T F S * S * L L G * I Y Q G H G
 141 I G L L H I * L I L T T W L N L P R P W
 141 Y R S A A H L V D P D Y L A K F T K A M
 421 TATAGGTCTGCTGCACATTTAGTTGATCCTGACTACTTGGCTAAATTTACCAAGGCCATG
 421 430 440 450 460 470
 421 ATATCCAGACGACGTGTAAATCAACTAGGACTGATGAACCGATTAAATGGTTCCGGTAC

 161 A H E S S S * * * S T * F Q A T S K Y S
 161 S S * E L F L M M I H V V S S N K Q I F
 161 E L M R A L P D D D P R S F K Q Q A N I
 481 GAGCTCATGAGAGCTCTTCCTGATGATGATCCACGTAGTTTCAAGCAACAAGCAAATATT
 481 490 500 510 520 530
 481 CTCGAGTACTCTCGAGAAGGACTACTACTAGGTGCATCAAAGTTCGTTGTTCTGTTTATAA

 181 L C L L * R G L * S S R V * S R Y S S S
 181 I V P I V T G L M I K * G L I K I F K F
 181 H C A Y C N G A Y D Q V G F D Q D I Q V
 541 CATTGTGCCTATTGTAACGGGGCTTATGATCAAGTAGGGTTTGATCAAGATATTCAAGTT
 541 550 560 570 580 590
 541 GTAACACGGATAACATTGCCCCGAATACTAGTTCATCCCAAAGTTCATATAAGTTCAA

 201 F L V A L F P I P * V V S L F L * K D F
 201 I S R G S F S H S I G C I F I S M K G F
 201 H F S W L F F P F H R L Y L Y F Y E R I
 601 CATTTCTCGTGGCTCTTTTCCCATTCATAGGTTGTATCTTTATTTCTATGAAAGGATT
 601 610 620 630 640 650
 601 GTAAAGAGCACCGAGAAAAAGGGTAAGGTATCCAACATAGAAAATAAGATACTTTCTCTAA

 221 G Q A D W * P G F R H A I L E L G C P C
 221 W A S * L V T R I S P C H F G T G M P L
 221 L G K L I G D P D F A M P F W N W D A P
 661 TTGGGCAAGCTGATTGGTGACCCGGATTTCGCCATGCCATTTTGGAACTGGGATGCCCT
 661 670 680 690 700 710
 661 AACCCGTTTCGACTAACCCTGAGGCTAAAGCGGTACGGTAAACCTTGACCCTACGGGGA

 241 R H A H T C H I C K P * L S T L R * Q A
 241 Q A C P Y L P Y M * T L T L H S T M T S
 241 A G M P I P A I Y V N P N S P L Y D D K
 721 GCAGGCATGCCCATACCTGCCATATATGTAAACCTAACTCTCCACTCTACGATGACAAG
 721 730 740 750 760 770
 721 CGTCCGTACGGGTATGGACGGTATATACATTTGGGATTGAGAGGTGAGATGCTACTGTTT

 261 Q C * P S G T K G R * S * L Q W H * * R
 261 A M L T I R H Q R S L I L I T M A L I K
 261 R N V N H Q A P K V A D L D Y N G T D K
 781 CGCAATGTAAACCATCAGGCACCAAAGGTCGCTGATCTTGATTACAATGGCACTGATAAA
 781 790 800 810 820 830
 781 GCGTTACAATTGGTAGTCCGTGGTTTCCAGCGACTAGAACTAATGTTACCGTGACTATTT

 281 Y N R H S N G T K * S Q G H V Q A D G V
 281 I * Q T Q Q W Y K V I S R S C T S R W C
 281 D I T D T A M V Q S N L K V M Y K Q M V
 841 GATATAACAGACACAGCAATGGTACAAAGTAATCTCAAGGTCATGTACAAGCAGATGGTG
 841 850 860 870 880 890
 841 CTATATTGTCTGTGTCGTTACCATGTTTCATTAGAGTTCCAGTACATGTTTCGTTCTACCAC

 301 W F K D G F S F P W K G V P C W R * T

Figura 17. Tripletes codificados para aminoácidos

[illegible]

gi 823237991 ref XP_012451640.1	TPISNAFPFIALDKLVRVEVPRPKKSRTKLEKEDEEEVLVLQNIQLDRDAAVKFDVYINDE
gi 508781069 gb EOY28325.1	NVVRNAFPFIVLDKTVSIEIPRPRKSRSKREKEEDEEVLVLEGIQLATQAAVKFDIYINDE
gi 1063510254 ref XP_017978713.1	NVVRNAFPFIVLDKTVSIEIPRPRKSRSKREKEEDEEVLVLEGIQLATQAAVKFDIYINDE
gi 508781073 gb EOY28329.1	YWCWKAFS-----
PP01-Tc	-----
gi 1063510262 ref XP_017978715.1	NVIRNAFPFIVLDKIVSIEIPRPKKSRTKLEKEEEEEEVLVLESIQLDTSTPVKFDIYINDE
gi 508781072 gb EOY28328.1	NVIRNAFPFIVLDKIVSIEIPRPKKSRTKLEKE-EEEVVLVLESIQLDTSTPVKFDIYINDE
gi 823237991 ref XP_012451640.1	DDETPTEPEDSEFAGSFTNLPNHHKTMKLNNTLPLTDLLEDLNVEGDESILVTLVP
gi 508781069 gb EOY28325.1	DDEAPSGPEDAEFAGSFTNIPHSHTA-KKLNTTFLSLAISDVLEDLDVEGDDNIVVTLVP
gi 1063510254 ref XP_017978713.1	DDEAPSGPEDAEFAGSFTNIPHSHTA-KKLNTTFLSLAISDVLEDLDVEGDDNIVVTLVP
gi 508781073 gb EOY28329.1	-----
PP01-Tc	-----
gi 1063510262 ref XP_017978715.1	DDEAPSGPEDSEFAGSFTNVPHNHS-SKKLETSTFLSLAISEVLEDLDVEGDDNIVVTLVP
gi 508781072 gb EOY28328.1	DDEAPSGPEDSEFAGSFTNVPHNHS-SKKLETSTFLSLAISEVLEDLDVEGDDNIVVTLVP
gi 823237991 ref XP_012451640.1	KEGKGLVSGNIKIDYIRD
gi 508781069 gb EOY28325.1	REGKGLVSGNIKVVDYIRE
gi 1063510254 ref XP_017978713.1	REGKGLVSGNIKVVDYIRE
gi 508781073 gb EOY28329.1	-----
PP01-Tc	-----
gi 1063510262 ref XP_017978715.1	REGKGLVSGNIKIDYIRE
gi 508781072 gb EOY28328.1	REGKGLVSGNIKIDYIRE

Figura 18. Alineamiento múltiple de aminoácidos de otras proteínas con la secuencia traducida del gen PP01-Tc realizado con el programa Muscle 3.8

El aislamiento de esta secuencia indica que existe base génica y evidencias experimentales de la existencia de al menos un gen codificante de polifenol oxidasa presente en hojas de cacao. A partir de este trabajo, el desafío a futuro, será desarrollar oligonucleótidos específicos para iniciar ensayos de expresión génica mediante PCR cuantitativa en diferentes estados de desarrollo de la mazorca, orientadas a analizar el comportamiento de este gen en situaciones de estrés de la planta de cacao.

Conclusiones

Se logró desarrollar un protocolo para extraer y purificar ARN total de alta calidad de hojas de cacao provenientes de plantas identificadas como resistentes y susceptibles a monilia.

El método de extracción de ARN total desarrollado permitió obtener ARN total de alta calidad y suficiente pureza para los ensayos de síntesis de ADNc.

Los ensayos de complementación alfa permitieron obtener tres clones positivos, el primer producto derivado de ADNg y dos productos derivados de ADNc, provenientes de plantas resistentes y susceptibles.

Se caracterizó de forma molecular el gen PPO1-Tc codificante de polifenol oxidasa (PPOs) en cacao Nacional, *Theobroma cacao* L.

Se corrobora la presencia de al menos un gen codificante de PPOs en plantas resistentes y susceptibles a monilia, con lo cual se acepta la hipótesis alternativa.

Recomendaciones

El transporte y conservación de las muestras vegetales debe hacerse a bajas temperaturas para la correcta extracción de ARN.

La extracción de ARN total debe realizarse con tejido foliar fresco, a fin de conservar la integridad de la molécula.

Los materiales y soluciones empleados en la extracción deben ser tratados con DEPC (dietilpirocarbonato) para eliminar las ARNasas activas que limitan el rendimiento durante la extracción.

El vector de clonación debe escogerse acorde a los extremos del producto de amplificación para mejorar la eficiencia en la clonación.

Se debería realizar un estudio de expresión cuantitativa para conocer el perfil molecular de este gen en diferentes estados de desarrollo de las hojas y mazorcas de cacao.

Referencias

- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool (BLAST). *Molecular Biology Journal*, 215(3), 403-410.
- Amores, F., Agama, J., Mite, F., Jiménez, J., Loor, G., & Quiroz, J. (2009). *EET 544 y EET 558. Nuevos clones de cacao nacional para la producción bajo riego en la Península de Santa Elena. Boletín Técnico N° 134*. Quevedo, Ecuador: INIAP.
- Amores, F., Palacios, Á., Jiménez, J., & Zhang, D. (2009). Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el nororiente de la provincia de Esmeraldas. *Boletín Técnico N° 135*. Quevedo: INIAP.
- Arévalo, E., Zúñiga, L., Arévalo, C., & Adriazola del Aguila, J. (2004). Cacao: Manejo Integrado del Cultivo y Transferencia de Tecnología en la Amazonía Peruana. Chiclayo: Instituto de Cultivos Tropicales.
- Bekele, F., Bekele, I., Butler, D., & Bidaisee, G. (2006). Patterns of Morphological Variation in a Sample of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Germplasm from the International Cocoa Genebank, Trinidad. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(933), 933-948. doi:10.1007/s10722-004-6692-x
- Birtic, S., & Kranner, I. (2006). Isolation of high-quality RNA from polyphenol-, polysaccharide- and lipid-rich seed. *Phytochemical Analysis*, 17(3), 144-148. doi:10.1002/pca.903
- Boeckx, T., Winters, A., Webb, J., & Kingston-Smith, A. (2015). Polyphenol oxidase in leaves; is there any significance to the chloroplastic localization? *Journal of Experimental Botany*, 66(12), 3571-3579. doi:10.1093/jxb/erv141
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2015). CDC. Recuperado el 2016, de Secuenciación de genomas y caracterización genética del virus de la influenza: <http://espanol.cdc.gov/enes/flu/professionals/laboratory/genetic-characterization.htm>
- Chan, K.-L., Ho, C.-L., Namasivayam, P., & Napis, S. (2007). A simple and rapid method for RNA isolation from plant tissues with high phenolic compounds and polysaccharides. *Protocol Exchange*. doi:10.1038/nprot.2007.184
- Chun, G. H., Chikako, H., Masayuki, K., Zilian, Z., Tomomi, T., & Takaya, M. (2002). A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(69), 69a-69g. doi:10.1007/BF02801935
- Constabel, P., & Barbehenn, R. (2008). Defensive Roles of Polyphenol Oxidase in Plants. En P. Constabel, *Induced Plant Resistance to Herbivory* (págs. 253-269). Victoria: Springer.
- Cortázar, A., & Silva, E. (Junio de 2004). *Universidad Nacional Autónoma de México*. Recuperado el 2016, de Instituto de Biotecnología: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
- Da Silva Gesteira, A., Micheli, F., Fortes Ferreira, C., & de Mattos Cascardo, J. C. (2003). Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis perniciososa*. *BioTechniques*, 35(3), 494-500.

- De Keukeleire, J., Roldán-Ruiz, I., Van Bockstaele, E., Heyerick, A., & De Keukeleire, D. (2006). Efficient extraction of high-quality total RNA from various hop tissues (*Humulus lupulus* L.). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 36(4), 355-362.
- de Necochea, R., & Canul, J. (Junio de 2004). *Universidad Nacional Autónoma de México*. Recuperado el 2016, de Instituto de Biotecnología: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf
- Devlin, T. (2006). *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Enríquez, G. (2004). *Cacao orgánico. Guía para productores ecuatorianos*. Quito: INIAP.
- Enriquez, G., & Soria, V. (1978). *Monilia disease of cocoa in Costa Rica*. Costa Rica: Turrialba.
- Espinosa, L. (2008). Guía Práctica sobre la Técnica de PCR. En L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, *Ecología Molecular* (págs. 517-541). México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- GAD San Carlos. (2016). *San Carlos*. Recuperado el 2016, de El Cantón: <http://www.gadsancarlos.gob.ec/index.php/joomlart/historia/el-canton>
- Galván, A., Tejada, M., Camargo, A., Higuera, J., & Fernández, E. (2006). *Universidad de Córdoba*. Recuperado el 2016, de <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/48%20TRANSFORMACI%C3%93N%20E%20COLI%20CON%20PL%C3%81SMIDO%20RECOMBINANTE.pdf>
- García, J., González, F., Fernández, E., & Ramírez, R. (2012). *Universidad de Castilla-La Mancha*. Recuperado el 2016, de <http://www.uclm.es/area/cta/cesia2012/cd/PDFs/1-TEC/TEC-P05T.pdf>
- Gil, M., Rojano, B., & Guerrero, C. (2016). *Corporación Universitaria Lasallista*. Recuperado el 2016, de <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/148/1/11.%20193-248.pdf>
- Gooding, P., Bird, C., & Robinson, S. (2001). Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta*, 213, 748-757. doi:10.1007/s004250100553
- Guerrero, G. (2014). *Revista Líderes*. Recuperado el 2016, de El cacao ecuatoriano su historia empezó antes del siglo XV: <http://www.revistalideres.ec/lideres/cacao-ecuatoriano-historia-empezo-siglo.html>
- Haruta, M., Murata, M., Kadokura, H., & Homma, S. (1999). Immunological and molecular comparison of polyphenol oxidase in Rosaceae fruit trees. *Phytochemistry*, 50, 1021-1025. doi:10.1016/S0031-9422(98)00633-5
- Hilger, H. (2016). *Freie Universität Berlin*. Recuperado el 2016, de Dahlen Centre of Plant Sciences (DCPS): <http://www2.biologie.fu-berlin.de/sysbot/poster/poster1.pdf>
- Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. (2016). *INIAP*. Recuperado el 2016, de Estación Experimental Tropical Pichilingue: http://www.iniap.gob.ec/nsite/index.php?option=com_content&view=article&id=35&Itemid=14

- Islas-Flores, I., Peraza-Echeverría, L., Cantó-Canché, B., & Rodríguez-García, C. (2006). Extraction of high-quality, melanin-free RNA from *Mycosphaerella fijiensis* for cDNA preparation. *Molecular Biotechnology*, 34(1), 45-50. doi:10.1385/MB:34:1:45
- Kim, J. Y., Seo, Y. S., Kim, J. E., Sung, S.-K., Song, K. J., An, G., & Kim, W. T. (2001). Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. *Plant Science*, 161(6), 1145-1152. doi:10.1016/S0168-9452(01)00522-2
- Kim, S., Leem, Y., Kim, K., & Choi, H. (2001). Cloning of an acidic laccase gene (clac2) from *Coprinus congregatus* and its expression by external pH. *FEMS Microbiology Letters*, 195(2), 151-156. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10513.x
- Kim, S.-H., & Hamada, T. (2005). Rapid and Reliable Method of Extracting DNA and RNA from Sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L). Lam. *Biotechnology Letters*, 27(23), 1841-1845. doi:10.1007/s10529-005-3891-2
- Leavell, H. R., & Clark, E. G. (1965). *Preventive Medicine for the Doctor in his Community. An Epidemiologic Approach*. New York: Mc-Graw Hill.
- Liao, Z., Chen, R., Chen, M., Yang, Y., Fu, Y., Zhang, Q., & Lan, X. (2006). Molecular Cloning and Characterization of the Polyphenol Oxidase Gene from Sweetpotato. *Molecular Biology*, 40(907), 907-913. doi:10.1134/S0026893306060094
- Llorente, B. (2010). Un rol biológico propuesto para las misteriosas polifenol oxidasas vegetales. *Tesis de Doctorado en Biología*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
- Loor, G. (2007). Contribution à l'étude de la domestication de la variété de cacaoyer Nacional d' Ecuateur: recherche de la variété native et de ses ancêtres sauvages. France: Tesis de Doctorado en Ciencias Agronómicas. Montpellier, France: Escuela Nacional Superior Agronómica de Montpellier.
- Loor, G., Fouet, O., Lemainque, A., Pavék, S., Boccara, M., Argout, X., . . . Lanaud, C. (2013). Insight into the Wild Origin, Migration and Domestication History of the Fine Flavour Nacional Theobroma cacao L. Variety from Ecuador. *PLoS ONE*, 8(2). doi:10.1371/annotation/2357f0f1-7dc3-4781-afb0-29a8ce56b3f0
- Loor, G., Risterucci, A., Courtois, B., Fouet, O., Jeanneau, M., Rosenquist, E., . . . Lanaud, C. (2009). Tracing the native ancestors of the modern Theobroma cacao L. population in Ecuador. *Tree Genetics & Genomes*, 5(3), 421-433. doi:10.1007/s11295-008-0196-3
- M.E., J. (1992). An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research*, 20(9), 2381. doi:10.1093/nar/20.9.2381
- Manickavelu, A., Kambara, K., Mishina, K., & Koba, T. (2007). An efficient method of purifying high quality RNA from wheat pistils. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54(2), 254-258. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.10.024
- Márquez, L., Serrato, A., & Cerritos, R. (2013). Secuenciación de fragmentos de ADN. En A. Cornejo-Romero, A. Serrato-Díaz, B. Rendón-Aguilar, & M. Rocha-Munive, *Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: aspectos teóricos y prácticos* (págs. 231-281). México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.

- Mayer, A. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318-2331. doi:10.1016/j.phytochem.2006.08.006
- Meisel, L., Fonseca, B., Gonzalez, S., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos, R., . . . Silva, H. (2005). A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biological Research*, 38(1), 83-88.
- Ministerio de Comercio Exterior. (2015). *Boletín Mensual de Comercio Exterior*. Recuperado el 2016, de Junio-Julio 2015: <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/07/JULfinal.pdf>
- Moncayo, R. (2016). *Asociación Nacional de Exportadores e Industriales de Cacao del Ecuador*. Recuperado el 20 de Julio de 2016, de Exportaciones de Cacao del Ecuador 2015 - ANECACAO: <http://www.anecacao.com/es/estadisticas/estadisticas-actuales.html>
- Morante-Carriel, J., Obrebska, A., Bru-Martínez, R., Carranza, M., Pico, R., & Nieto, E. (2014). Distribución, localización e inhibidores de las polifenol oxidasas en frutos y vegetales usados como alimento. *Ciencia y Tecnología*, 7(1), 23-31.
- Morante-Carriel, J., Sellés-Marchart, S., Martínez-Márquez, A., Martínez-Esteso, M. J., Luque, I., & Bru-Martínez, R. (2014). RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. *Analytic Biochemistry*, 452(1), 46-53.
- Motamayor, J., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Llor, R., Kuhn, D., Brown, S., & Schnell, R. (1 de Octubre de 2008). Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L.). *Plos One*, 3(10). doi:10.1371/journal.pone.0003311
- Muñoz, K., Bravo, K., Zapata, P., & Londoño, J. (2007). Caracterización preliminar del enzima polifenol oxidasa en frutas tropicales: implicaciones en su proceso de industrialización. *Scientia et Technica*, 1(33), 161-164.
- Newman, S., Eannetta, N., Yu, H., Prince, J., de Vicente, M., Anskley, S., & Steffens, J. (1993). Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Molecular Biology*, 21(6), 1035-1051.
- Osorio, R. (2010). Estudio del efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Moniliophthora roreri* en plantas de *Theobroma cacao* en la provincia de Esmeraldas. *Proyecto para la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial*. Quito: Escuela Politécnica Nacional.
- Padilla, C., Diez, J., Martínez, E., Bárcena, J., & García, C. (2006). Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. Córdoba: Universidad de Córdoba.
- Portillo, M., Fenoll, C., & Escobar, C. (2006). Evaluation of different RNA extraction methods for small quantities of plant tissue: Combined effect of reagent type and homogenization procedure on RNA quality-integrity and yield. *Physiologia Plantarum*, 128(1), 1-7. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00716.x
- Quiroz, J., & Soria, J. (1994). *Caracterización fenotípica del cacao Nacional del Ecuador*. Quito: INIAP.

- Reid, K., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., & Lund, S. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*, 6(27). doi:10.1186/1471-2229-6-27
- Ríos, Rivera, & López. (2004). *Laboratorio de Genética de Bacterias*. Mayaguez: Universidad de Puerto Rico.
- Sánchez-Mora, F., Zambrano, J., Vera, J., Ramos, R., Garcés, F., & Vascónez, G. (2014). Productividad de clones de cacao tipo Nacional en una zona del bosque húmedo tropical de la provincia de Los Ríos, Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 7(1), 33-41.
- Sellés-Marchart, S., Luque, I., Casado-Vela, J., Martínez-Esteso, M. J., & Bru-Martínez, R. (2008). Proteomics of Multigenic Families from Species underrepresented in Databases: The Case of Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Polyphenol Oxidases. *Journal of Proteome Research*, 7(9), 4095-4106. doi:10.1021/pr700687c
- Shi, H., & Bressan, R. (2006). RNA Extraction. *Methods in Molecular Biology*, 323, 345-348. doi:10.1385/1-59745-003-0:345
- Solis, K., & Suárez, C. (2006). Uso de *Trichoderma* spp para control del complejo Moniliasis-Escoba de Bruja del cacao en Ecuador. *15th Conferencia Internacional de Investigación en Cacao*. Quevedo, Ecuador: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Recuperado el 2016
- Suárez, C., Moreira, M., & Vera, J. (1993). *Manual del Cultivo del Cacao*. Quevedo: INIAP.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids*, 25(24), 4876-4882.
- Thygesen, P., Dry, I., & Robinson, S. (1995). Polyphenol oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiology*, 109(2), 525-531. doi:10.1104/pp.109.2.525
- Tran, L., Taylor, J., & Constabel, P. (2012). The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics*, 13(395). doi:10.1186/1471-2164-13-395
- Villavicencio, M., & Jiménez, M. (2010). Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco provincias de la Costa Ecuatoriana. *CICYT*. Recuperado el 2016, de <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/10957/Caracterizaci%C3%B3n%20morfol%C3%B3gica%20fisiol%C3%B3gica%20y%20patog%C3%A9nica.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Wang, J., & Constabel, P. (2004). Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta*, 220(1), 87-89. doi:10.1007/s00425-004-1327-1
- Wang, S., Hunter, W., & Plant, A. (2000). Isolation and purification of functional total RNA from woody ranches and needles of Sitka and white spruce. *BioTechniques*, 28(2), 292-296.

War, A., Paulraj, M., Ahmad, T., Buhroo, A., Hussain, B., & Ignacimuthu, S. S. (2012). Mechanisms of Plant Defense against Insect Herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1306-1320. doi:10.4161/psb.21663

Anexos

Anexo 1. Planta de cacao susceptible a monilia L44H88.



Anexo 2. Planta de cacao resistente a monilia L8H12.



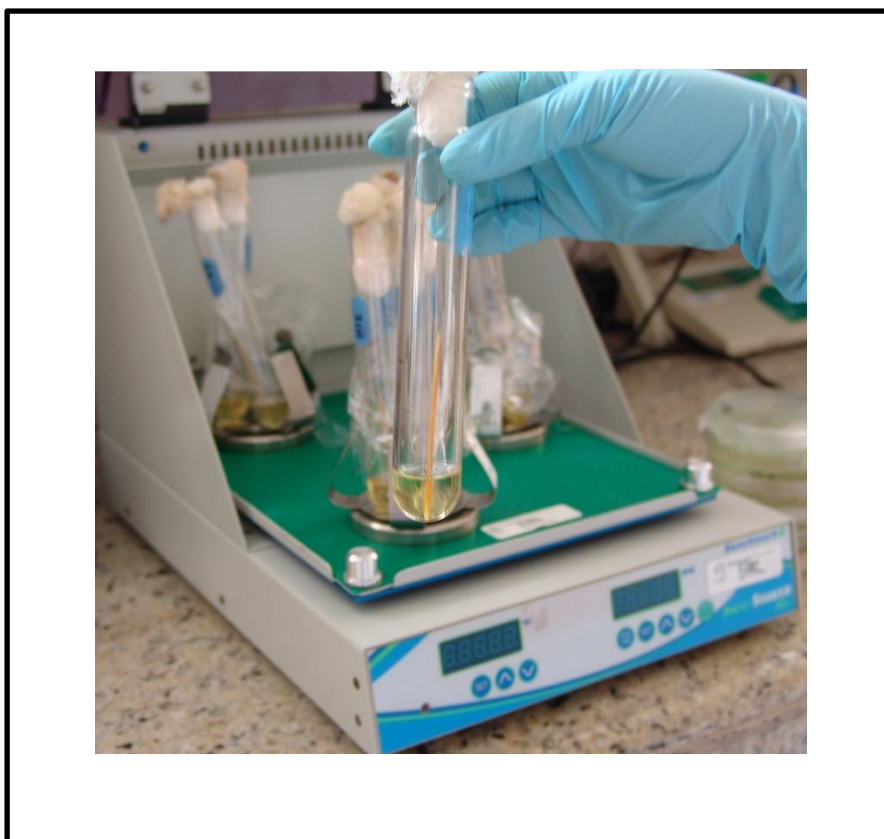
Anexo 3. Incubación a 65°C durante la extracción de ARN total de cacao.



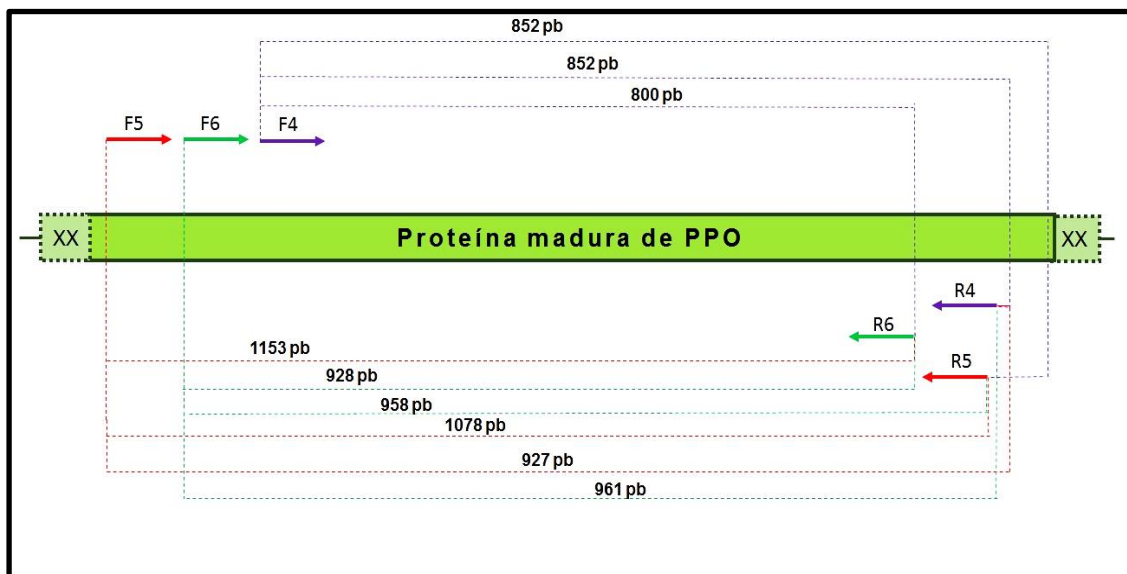
Anexo 4. Electroforesis en TAE 1X



Anexo 5. Incubación de las colonias de *E.coli* transformadas en medio SOC.



Anexo 6. Esquema de orientación de los oligonucleótidos empleados en este trabajo. Las flechas indican la orientación de los oligonucleótidos (Forward y Reverse) y las líneas discontinuas indican la combinación entre ellos.



Anexo 7. Alineamiento múltiple de PPOs no caracterizadas de cacao y otras familias cercanas al cacao

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

XM_007033746.1 -----
XM_007042098.1 ATTAATAAATATATATATATATTTTCTTAAATAATACAAAATGATCTTAACCACGAGGCA
XM_007042097.1 ATTAATAAATATATATATATATTTTCTTAAATAATACAAAATGATCTTAACCACGAGGCA
XM_007042100.1 -----
XM_007042099.1 -----

```

```

XM_007033746.1 -----
XM_007042098.1 ACCATGTCATATATTTTAAACCCATGCAGATAATTTGAAAGGCTTAATTATTGGCTCGTG
XM_007042097.1 ACCATGTCATATATTTTAAACCCATGCAGATAATTTGAAAGGCTTAATTATTGGCTCGTG
XM_007042100.1 -----
XM_007042099.1 -----

```

```

XM_007033746.1 -----TGTAGTAATTAAAAA
XM_007042098.1 TCCTTCTACTAGTCATTAGGCTAGAAATTAAGCTTTTAACTTATACTATTAATTAAGG
XM_007042097.1 TCCTTCTACTAGTCATTAGGCTAGAAATTAAGCTTTTAACTTATACTATTAATTAAGG
XM_007042100.1 -----
XM_007042099.1 -----

```

```

XM_007033746.1 GCTATGGC-----
XM_007042098.1 GTTATTCCTGTTGTCACCAGAGAAGTCGCAATCCGCTAATTATTGATGCATCGAGTAGG
XM_007042097.1 GTTATTCCTGTTGTCACCAGAGAAGTCGCAATCCGCTAATTATTGATGCATCGAGTAGG
XM_007042100.1 -----
XM_007042099.1 -----

```

```

XM_007033746.1 -----TTCTCTTTTACCA-----
XM_007042098.1 TGAGCATAATCTACCAATATCTTCTTTTACTTTGTTACGTAAAGAAATTACTTGCCTTCT
XM_007042097.1 TGAGCATAATCTACCAATATCTTCTTTTACTTTGTTACGTAAAGAAATTACTTGCCTTCT
XM_007042100.1 -----
XM_007042099.1 -----

```

```

XM_007033746.1 -----
XM_007042098.1 GGTTGCACGGGTCCAAGTTGCACAAAGTCTGCATGTATTTGCACACACCATGCTGTATTT
XM_007042097.1 GGTTGCACGGGTCCAAGTTGCACAAAGTCTGCATGTATTTGCACACACCATGCTGTATTT
XM_007042100.1 -----
XM_007042099.1 -----

```

```

XM_007033746.1 -----
XM_007042098.1 AATTTGTCTGATCTAAGGCACATGTTTTCAGACATGGACAGTCAATTTTGTCTGTCTTCG
XM_007042097.1 AATTTGTCTGATCTAAGGCACATGTTTTCAGACATGGACAGTCAATTTTGTCTGTCTTCG
XM_007042100.1 -----
XM_007042099.1 -----

```

```

XM_007033746.1 -----
XM_007042098.1 GGGAAATTTAATAAGAAAATGATTCCCAGACGCCCTTTTGAATTGATAATATAATATTA
XM_007042097.1 GGGAAATTTAATAAGAAAATGATTCCCAGACGCCCTTTTGAATTGATAATATAATATTA
XM_007042100.1 -----
XM_007042099.1 -----

```

```

XM_007033746.1 -----TCATCATCCACCAGCACCTCTAACACTTTTCCACC--TCC
XM_007042098.1 TTATTGCAACGATTTTGTTTTATAACTCGTGAGAAATTTAGAGACCGTTGATTTCAATCA
XM_007042097.1 TTATTGCAACGATTTTGTTTTATAACTCGTGAGAAATTTAGAGACCGTTGATTTCAATCA
XM_007042100.1 -----
XM_007042099.1 -----TTTGTTTTATAACTCGTGAGAAATTTAGAGACCGTTGATTTCAATCA

```

```

XM_007033746.1 ATTACCATCCTT-----CATTCCTTCCAAAAAC
XM_007042098.1 AAGACCAGCTGTTTGCAGTGAACATTGAATTATTTAAGTTGCAGTATTCATGCGTAAAGT
XM_007042097.1 AAGACCAGCTGTTTGCAGTGAACATTGAATTATTTAAGTTGCAGTATTCATGCGTAAAGT
XM_007042100.1 -----
XM_007042099.1 AAGACCAGCTGTTTGCAGTGAACATTGAATTATTTAAGTTGCAGTATTCATGCGTAAAGT

```


XM_007033746.1	TCCCGGCTACTGCTGT---TAGGCCGTGCTGCACATTTAGTTGATGATGCCTACGCGAGCTAAAT
XM_007042098.1	TCGCCAAAACGCTGTGCGCAGGCCAGTC---CAACTTGTGGACGAGAATACATCGCCAAA
XM_007042097.1	TCGCCAAAACGCTGTGCGCAGGCCAGTC---CAACTTGTGGACGAGAATACATCGCCAAA
XM_007042100.1	TCGCCAAAACGCTGTGCGCAGGCCAGTC---CAACTTGTGGACGAGAATACATCGCCAAA
XM_007042099.1	TCGCCAAAACGCTGTGCGCAGGCCAGTC---CAACTTGTGGACGAGAATACATCGCCAAA ** * ***** ** *
XM_007033746.1	TATTCAGAGGCCATTGAACTCATGAAAGCTCTTCTGCCAACGATCCACGTGGTTTCATG
XM_007042098.1	TACAACAAGGCCCTTGTGCGATCATGAAGTCTTGCCATACGATGATCCTCGAAGTTTTGCC
XM_007042097.1	TACAACAAGGCCCTTGTGCGATCATGAAGTCTTGCCATACGATGATCCTCGAAGTTTTGCC
XM_007042100.1	TACAACAAGGCCCTTGTGCGATCATGAAGTCTTGCCATACGATGATCCTCGAAGTTTTGCC
XM_007042099.1	TACAACAAGGCCCTTGTGCGATCATGAAGTCTTGCCATACGATGATCCTCGAAGTTTTGCC ** ** * ** *
XM_007033746.1	CAACAAGCCAATATTCACTGTGCCTACTGTGATAGGGCTTATCACCAACTGGG-----
XM_007042098.1	CGTCAAGCCAACCTTGCACGTGCTCTTTTGTACTGGAGCCTACGACCAACAAAACCTCCAAT
XM_007042097.1	CGTCAAGCCAACCTTGCACGTGCTCTTTTGTACTGGAGCCTACGACCAACAAAACCTCCAAT
XM_007042100.1	CGTCAAGCCAACCTTGCACGTGCTCTTTTGTACTGGAGCCTACGACCAACAAAACCTCCAAT
XM_007042099.1	CGTCAAGCCAACCTTGCACGTGCTCTTTTGTACTGGAGCCTACGACCAACAAAACCTCCAAT * ***** * ***** ** * * * * *
XM_007033746.1	-----TTCCTCG-----ATCTTGA---GC
XM_007042098.1	ACCCCTCTTAGTATTACAGAACATGGTTATTCTTTCCCTGGCACCGCATGATGATCTAC
XM_007042097.1	ACCCCTCTTAGTATTACAGAACATGGTTATTCTTTCCCTGGCACCGCATGATGATCTAC
XM_007042100.1	ACCCCTCTTAGTATTACAGAACATGGTTATTCTTTCCCTGGCACCGCATGATGATCTAC
XM_007042099.1	ACCCCTCTTAGTATTACAGAACATGGTTATTCTTTCCCTGGCACCGCATGATGATCTAC ***** ** * *
XM_007033746.1	TTCAA-----ATCTTGGGCAAGTTGATTGATGGCCCACTTTTGCTCTGCCGTTTTGG
XM_007042098.1	TTCCACGAACGCATCATCGGTAGTCTAATCGGAGATGACACGTTTGCTTTTCCGGTTTGG
XM_007042097.1	TTCCACGAACGCATCATCGGTAGTCTAATCGGAGATGACACGTTTGCTTTTCCGGTTTGG
XM_007042100.1	TTCCACGAACGCATCATCGGTAGTCTAATCGGAGATGACACGTTTGCTTTTCCGGTTTGG
XM_007042099.1	TTCCACGAACGCATCATCGGTAGTCTAATCGGAGATGACACGTTTGCTTTTCCGGTTTGG *** * ** * * * * *
XM_007033746.1	AAGTGGGATTCTCTGCGCGCATGCAAATGCCTGCCATGTATACAAACACTAAATCTTCA
XM_007042098.1	ACTTGGGACATCCCTGAAGGAATGGTGATGCCGGATATTTACGCGAACATGAATTTATCA
XM_007042097.1	ACTTGGGACATCCCTGAAGGAATGGTGATGCCGGATATTTACGCGAACATGAATTTATCA
XM_007042100.1	ACTTGGGACATCCCTGAAGGAATGGTGATGCCGGATATTTACGCGAACATGAATTTATCA
XM_007042099.1	ACTTGGGACATCCCTGAAGGAATGGTGATGCCGGATATTTACGCGAACATGAATTTATCA * ***** ** * * * * *
XM_007033746.1	CTCTACGACAGCTCCGCGACCGGAACCGTTACCCACCAGCGCTGGTTGATTATAATGGC
XM_007042098.1	TTCTTTACAAAGGTACGTGACTTTTACATTTTCCACCGCGGGTGGCAGATTTGAACCTAC
XM_007042097.1	TTCTTTACAAAGGTACGTGACTTTTACATTTTCCACCGCGGGTGGCAGATTTGAACCTAC
XM_007042100.1	TTCTTTACAAAGGTACGTGACTTTTACATTTTCCACCGCGGGTGGCAGATTTGAACCTAC
XM_007042099.1	TTCTTTACAAAGGTACGTGACTTTTACATTTTCCACCGCGGGTGGCAGATTTGAACCTAC *** ** * * * * * * * * * * *
XM_007033746.1	ACTGAAGAGACTACTACGGA---TAAAGATCAAACGACAAGCAATCTTAG-AGTCATGAA
XM_007042098.1	TTTCAGGAAACAAATTTGAGTCCTCAAGAGCAGTTGG-ATACAACTTGGCATTATGTA
XM_007042097.1	TTTCAGGAAACAAATTTGAGTCCTCAAGAGCAGTTGG-ATACAACTTGGCATTATGTA
XM_007042100.1	TTTCAGGAAACAAATTTGAGTCCTCAAGAGCAGTTGG-ATACAACTTGGCATTATGTA
XM_007042099.1	TTTCAGGAAACAAATTTGAGTCCTCAAGAGCAGTTGG-ATACAACTTGGCATTATGTA * * * * * * * * * * * * * * *
XM_007033746.1	TAGGCAGATGATATCTAATGGCAAGACCACTAAGGTTTTCCAGGAAGTCCCTACCGTAC
XM_007042098.1	TAACCAAATGGTATCTGGTGCAAGAAGACGGAATTGTTTCATGGGATGCACATA---TAA
XM_007042097.1	TAACCAAATGGTATCTGGTGCAAGAAGACGGAATTGTTTCATGGGATGCACATA---TAA
XM_007042100.1	TAACCAAATGGTATCTGGTGCAAGAAGACGGAATTGTTTCATGGGATGCACATA---TAA
XM_007042099.1	TAACCAAATGGTATCTGGTGCAAGAAGACGGAATTGTTTCATGGGATGCACATA---TAA ** * * * * * * * * * * * * * *
XM_007033746.1	AGGTGATGA-----ACCTGATCCAGGAGCCGGTTCGCTCGAGGACATTCC
XM_007042098.1	AGCCAATGAAGGATATTGTAATTCACCCGGCACGTAGAGAGTGCCCTCACAACTTT
XM_007042097.1	AGCCAATGAAGGATATTGTAATTCACCCGGCACGTAGAGAGTGCCCTCACAACTTT
XM_007042100.1	AGCCAATGAAGGATATTGTAATTCACCCGGCACGTAGAGAGTGCCCTCACAACTTT
XM_007042099.1	AGCCAATGAAGGATATTGTAATTCACCCGGCACGTAGAGAGTGCCCTCACAACTTT ** **** * * * * * * * * * *
XM_007033746.1	TCAT-----GGAACAATTCACAACCTGGCTGTGGAGCATTGG-----
XM_007042098.1	GCATACATGGGTAGGGAGCAATCTAGAACCTGGAAGGGAGGATATGGGTAAATTTCTACTC
XM_007042097.1	GCATACATGGGTAGGGAGCAATCTAGAACCTGGAAGGGAGGATATGGGTAAATTTCTACTC
XM_007042100.1	GCATACATGGGTAGGGAGCAATCTAGAACCTGGAAGGGAGGATATGGGTAAATTTCTACTC
XM_007042099.1	GCATACATGGGTAGGGAGCAATCTAGAACCTGGAAGGGAGGATATGGGTAAATTTCTACTC *** **** * * * * * * * * *

```

XM 007033746.1 -----AAGA-----CGTTGGGAG--
XM 007042098.1 AGCAGCAAGAGACCCCTATTTTCTATGCACATCATTCCAATATAGATCGTCTTTGGGAAGT
XM 007042097.1 AGCAGCAAGAGACCCCTATTTTCTATGCACATCATTCCAATATAGATCGTCTTTGGGAAGT
XM_007042100.1 AGCAGCAAGAGACCCCTATTTTCTATGCACATCATTCCAATATAGATCGTCTTTGGGAAGT
XM_007042099.1 AGCAGCAAGAGACCCCTATTTTCTATGCACATCATTCCAATATAGATCGTCTTTGGGAAGT
          ****                      * *****

XM 007033746.1 -CGAAGCGAAA-----AGATTACAATGACCCAGATTGGCTTGATTCTC
XM_007042098.1 TTGGAGGGAGATTTCATAAACATGAATTGGATATCAAAGATCCAGATTGGCTAAACTCTTT
XM_007042097.1 TTGGAGGGAGATTTCATAAACATGAATTGGATATCAAAGATCCAGATTGGCTAAACTCTTT
XM_007042100.1 TTGGAGGGAGATTTCATAAACATGAATTGGATATCAAAGATCCAGATTGGCTAAACTCTTT
XM 007042099.1 TTGGAGGGAGATTTCATAAACATGAATTGGATATCAAAGATCCAGATTGGCTAAACTCTTT
          * * * * *                ***   * * * * * * * * * * * * * * *

XM_007033746.1 GTTTCTTTTCTATGACGAGAATGCGAATCTTGTTCTGTGTCAAAGTTCGTTCATTGCATTGA
XM_007042098.1 CTTTTTCTTTTATGATGAGAACTTGAAGCTGGTAAAGATTAAGGTTTCGTGATGTTCTTGA
XM_007042097.1 CTTTTTCTTTTATGATGAGAACTTGAAGCTGGTAAAGATTAAGGTTTCGTGATGTTCTTGA
XM_007042100.1 CTTTTTCTTTTATGATGAGAACTTGAAGCTGGTAAAGATTAAGGTTTCGTGATGTTCTTGA
XM 007042099.1 CTTTTTCTTTTATGATGAGAACTTGAAGCTGGTAAAGATTAAGGTTTCGTGATGTTCTTGA
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

XM_007033746.1 TA--GTAAACTTTGGGATACGATTATCAAGATGTTGATCTTCCATGGCTAAATCTAAG
XM_007042098.1 TATCTCCAAACTT--GGTTATTCTTACGAGGAGGTCGATCGTCCGTGGTTGAA---TAAA
XM_007042097.1 TATCTCCAAACTT--GGTTATTCTTACGAGGAGGTCGATCGTCCGTGGTTGAA---TAAA
XM_007042100.1 TATCTCCAAACTT--GGTTATTCTTACGAGGAGGTCGATCGTCCGTGGTTGAA---TAAA
XM_007042099.1 TATCTCCAAACTT--GGTTATTCTTACGAGGAGGTCGATCGTCCGTGGTTGAA---TAAA
          **      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

XM 007033746.1 C-----CAACTCCTCGAAAGCTCGCC-----AAGAAAGT
XM_007042098.1 CGTCCACGCGCTTCAGTTCGCGCAAAGGTAGCCCGTCAGATATTAATAATCGAAAGAGAAT
XM_007042097.1 CGTCCACGCGCTTCAGTTCGCGCAAAGGTAGCCCGTCAGATATTAATAATCGAAAGAGAAT
XM_007042100.1 CGTCCACGCGCTTCAGTTCGCGCAAAGGTAGCCCGTCAGATATTAATAATCGAAAGAGAAT
XM_007042099.1 CGTCCACGCGCTTCAGTTCGCGCAAAGGTAGCCCGTCAGATATTAATAATCGAAAGAGAAT
          *              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

XM 007033746.1 GGCAA-----CTGGTGGTCTCGGGATT-----GCTCTAGCAGC-----
XM_007042098.1 GAGAACCAATTCCGACTGTCTCTGATTTGCGGCCCCATGGTCGGGCTCTAGACGCTAGC
XM_007042097.1 GAGAACCAATTCCGACTGTCTCTGATTTGCGGCCCCATGGTCGGGCTCTAGACGCTAGC
XM_007042100.1 GAGAACCAATTCCGACTGTCTCTGATTTGCGGCCCCATGGTCGGGCTCTAGACGCTAGC
XM 007042099.1 GAGAACCAATTCCGACTGTCTCTGATTTGCGGCCCCATGGTCGGGCTCTAGACGCTAGC
          *   * *              * * * * * * * * * * * * * * * * *

XM_007033746.1 --AGAAACAAAGAAAAAGAAATCAAGGAGT-----AAAAAGGAAAAGAGAGGAA
XM_007042098.1 TTGACAGTAAAGGTTAACAGGTCTAAAAATCATTTGACCAAGAGGGAGAAAGGAGAGGAA
XM_007042097.1 TTGACAGTAAAGGTTAACAGGTCTAAAAATCATTTGACCAAGAGGGAGAAAGGAGAGGAA
XM_007042100.1 TTGACAGTAAAGGTTAACAGGTCTAAAAATCATTTGACCAAGAGGGAGAAAGGAGAGGAA
XM 007042099.1 TTGACAGTAAAGGTTAACAGGTCTAAAAATCATTTGACCAAGAGGGAGAAAGGAGAGGAA
          *   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

XM 007033746.1 GAGGAGATA-TTGATAATAGAGACAATCGAGTTAGAGAGAGATTCAATTCGTGAAAGTTGA
XM_007042098.1 GAGGTCATAGTTGTTACCGG----CATTGAAGTGAAAGGGGACGCATATGCTAAGTTTGA
XM_007042097.1 GAGGTCATAGTTGTTACCGG----CATTGAAGTGAAAGGGGACGCATATGCTAAGTTTGA
XM_007042100.1 GAGGTCATAGTTGTTACCGG----CATTGAAGTGAAAGGGGACGCATATGCTAAGTTTGA
XM_007042099.1 GAGGTCATAGTTGTTACCGG----CATTGAAGTGAAAGGGGACGCATATGCTAAGTTTGA
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

XM 007033746.1 TGTATATGTTAATGATGAGGATGATTGACAATTGGCCCAGAATACACAGAGTTCGCCGG
XM_007042098.1 TGTGTATGTAACATGGTTGATCAGACGATAATCTCTCCAAAGTCCAGGGAATTCGCCGG
XM_007042097.1 TGTGTATGTAACATGGTTGATCAGACGATAATCTCTCCAAAGTCCAGGGAATTCGCCGG
XM_007042100.1 TGTGTATGTAACATGGTTGATCAGACGATAATCTCTCCAAAGTCCAGGGAATTCGCCGG
XM 007042099.1 TGTGTATGTAACATGGTTGATCAGACGATAATCTCTCCAAAGTCCAGGGAATTCGCCGG
          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

XM 007033746.1 GAGCTTTATGAATGTGCCTCATAAGCATAAGCATGAGAAGAGAAT-----GAAGACATG
XM_007042098.1 GACCTTCG-----CTCACATTCTGGGGGTGGGGAGATGATGAAGAGGAAGATCGA
XM_007042097.1 GACCTTCG-----CTCACATTCTGGGGGTGGGGAGATGATGAAGAGGAAGATCGA
XM_007042100.1 GACCTTCG-----CTCACATTCTGGGGGTGGGGAGATGATGAAGAGGAAGATCGA
XM 007042099.1 GACCTTCG-----CTCACATTCTGGGGGTGGGGAGATGATGAAGAGGAAGATCGA
          ** ***                * * * * * * * * * * * * * * * * *

XM_007033746.1 CTTGAGGTTGAGGCTCACAGATTTGTTGGAGGATTTGGGAGCCGAGGACGATGACAGTGT
XM_007042098.1 TCTCAAACCTGGGAGTGTGAGAACTATTGGAAGATTTGGAAGCAATGGAAGATGAAAGCAT
XM_007042097.1 TCTCAAACCTGGGAGTGTGAGAACTATTGGAAGATTTGGAAGCAATGGAAGATGAAAGCAT
XM_007042100.1 TCTCAAACCTGGGAGTGTGAGAACTATTGGAAGATTTGGAAGCAATGGAAGATGAAAGCAT
XM 007042099.1 TCTCAAACCTGGGAGTGTGAGAACTATTGGAAGATTTGGAAGCAATGGAAGATGAAAGCAT
          * *   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

XM 007033746.1 TGTGGTGACTTTGGTGCCAAGAAAAGGAAAGGGT---GTTGTTACCGTTGGGGGTATCAA
XM 007042098.1 CTGGGTCACATTGTTGCCAAGGACAGCAAGTTGTAGCAGTGTAACAATTGAAGGAGTACA
XM 007042097.1 CTGGGTCACATTGTTGCCAAGGACAGCAAGTTGTAGCAGTGTAACAATTGAAGGAGTACA
XM_007042100.1 CTGGGTCACATTGTTGCCAAGGACAGCAAGTTGTAGCAGTGTAACAATTGAAGGAGTACA
XM_007042099.1 CTGGGTCACATTGTTGCCAAGGACAGCAAGTTGTAGCAGTGTAACAATTGAAGGAGTACA
*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

XM 007033746.1 GATTGAGTTTGCTCAAGATTAATTGGATGATTAATCAGTTAATTTGATG-CTCCAGGTTT
XM_007042098.1 AATTAAGTAT-----ATCAAATAAATTCATGTCTTCA--TTA
XM_007042097.1 AATTAAGTAT-----ATCAAATAAATTCATGTCTTCA--TTA
XM_007042100.1 AATTAAGTAT-----ATCAAATAAATTCATGTCTTCA--TTA
XM_007042099.1 AATTAAGTAT-----ATCAAATAAATTCATGTCTTCA--TTA
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

XM_007033746.1 GGGAAAATCTTCCTAGTTTGCATGGAAAGTTAAAGAAATTCAATAAGCCCACATCAC---
XM_007042098.1 GAGAAAG-----AAGGAATGAGAGAAAAAAGTTTGAAGTCTCCTTTATTTT
XM_007042097.1 GAGAAAG-----AAGGAATGAGAGAAAAAAGTTTGAAGTCTCCTTTATTTT
XM_007042100.1 GAGAAAG-----AAGGAATGAGAGAAAAAAGTTTGAAGTCTCCTTTATTTT
XM_007042099.1 GAGAAAG-----AAGGAATGAGAGAAAAAAGTTTGAAGTCTCCTTTATTTT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

XM_007033746.1 -----CCATTGAAGCAGTGTCTACTACTATTAATATCTATGTTAT--
XM_007042098.1 GGAGATCTCATTTTTAGTCATTGAAACAAAG-----ATAAATAATGTTTATTTAATGA
XM_007042097.1 GGAGATCTCATTTTTAGTCATTGAAACAAAG-----ATAAATAATGTTTATTTAATGA
XM_007042100.1 GGAGATCTCATTTTTAGTCATTGAAACAAAG-----ATAAATAATGTTTATTTAATGA
XM_007042099.1 GGAGATCTCATTTTTAGTCATTGAAACAAAG-----ATAAATAATGTTTATTTAATGA
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

XM 007033746.1 -----ACTAATCGCTTTTAACATCTATGCA---AAGGTGTCTTACCCTACAATTTTATCT
XM_007042098.1 TGGAAAATATTGTCTTTTATTCTGTCTAGATTCAGAGTAATTTCTCGAATAAAGTTATTT
XM_007042097.1 TGGAAAATATTGTCTTTTATTCTGTCTAGATTCAGAGTAATTTCTCGAATAAAGTTATTT
XM_007042100.1 TGGAAAATATTGTCTTTTATTCTGTCTAGATTCAGAGTAATTTCTCGAATAAAGTTATTT
XM_007042099.1 TGGAAAATATTGTCTTTTATTCTGTCTAGATTCAGAGTAATTTCTCGAATAAAGTTATTT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

XM 007033746.1 AT-----GTAATAC-----TAATTGCTTTGAAATAAGGCAGTTCTTCATGTTG
XM_007042098.1 TTCCCTCATAGCACGTGTCATGGGCATGTTTTCAGTGGGTAAAG--AGCCCTTCAATTAT
XM_007042097.1 TTCCCTC-----
XM_007042100.1 TTCCCTCATAGCACGTGTCATGGGCATGTTTTCAGTGGGTAAAG--AGCCCTTCAATTAT
XM_007042099.1 TTCCCTCATAGCACGTGTCATGGGCATGTTTTCAGTGGGTAAAG--AGCCCTTCAATTAT
*

XM_007033746.1 TTTTAAATCTGCTCTGTATTACTTAAATTAAGATGGAAATGTTGT-----
XM_007042098.1 TTTCTTATCTATTATTATCAACACATTTATTATGAC-----
XM_007042097.1 -----
XM_007042100.1 TTTCTTATCTATTATTATCAACACATTTATTATGACACGTGAATTAGTCTTGGACCACT
XM_007042099.1 TTTCTTATCTATTATTATCAACACATTTATTATGACACGTGAATTAGTCTTGGACCACT

XM 007033746.1 -----
XM_007042098.1 -----
XM_007042097.1 -----
XM_007042100.1 TATTCGTCTGACCCAACCCATATTCGTCTATGTCTATCAACAATCTTAGTTTAC
XM_007042099.1 TATTCGTCTGACCCAACCCATATTCGTCTATGTCTATCAACAATCTTAGTTTAC

```

Anexo 8. Combinaciones de oligonucleótidos y tamaño esperado de amplicones

Primer forward	Primer reverse	Tamaño teórico del amplicón
F4	R4	852 pb
	R5	800 pb
	R6	852 pb
F5	R4	927 pb
	R5	1078 pb
	R6	1153 pb
F6	R4	961 pb
	R5	958 pb
	R6	928 pb

Anexo 9. Vector de clonación y sitios de unión de los oligonucleótidos

